

Etablierung einer Methode  
zur Messung von Nitrat in Serum, Urin und anderen Medien  
mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Ionenchromatographie

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von	Esra Tas
aus	Ankara-Türkei

Giessen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde

Leiter: Prof. Dr. med. Gortner

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Dr. rer. nat. HJ Schwandt, Dr. med. S Demirakca, Dr. med. J Dötsch

Gutachter: Prof. Dr. med. PG Kuehl

Gutachter: Prof. Dr. med. N. Katz

Tag der Disputation: 29.01.2002

Meiner lieben Schwester Berna und Bernd gewidmet.

---

1	Einleitung .....	1
1.1	<b>Historischer Hintergrund .....</b>	<b>1</b>
1.2	<b>NO-Stoffwechsel .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Synthese und biologische Wirkung des NO .....	2
1.2.2	Pathophysiologische Mechanismen und klinische Gesichtspunkte des NO .....	3
1.2.3	NO-Abbau .....	5
1.3	<b>Nitrat als quantitativer Indikator von NO .....</b>	<b>5</b>
2	Fragestellung .....	7
3	Material und Methoden .....	8
3.1	<b>Materialien .....</b>	<b>8</b>
3.1.1	Verwendete Materialien und Chemikalien .....	8
3.1.2	Apparativer Aufbau eines HPLC Systems.....	10
3.2	<b>Herstellung der Standards.....</b>	<b>11</b>
3.2.1	Nitratarbeitslösung (Spike).....	11
3.2.2	Interner Standard .....	12
3.2.3	Mobile Phase (Eluens).....	12
3.3	<b>Etablierung der Methode für Serum .....</b>	<b>12</b>
3.3.1	Interner Standard .....	12
3.3.2	Ultrafiltration .....	13
3.3.3	Flüssig-flüssig-Extraktion .....	14
3.3.4	Fest-flüssig-Extraktion .....	14
3.3.5	Ermittlung des Auffangvolumens.....	15
3.3.6	Einstellung der optimalen Chromatographiebedingungen.....	16
3.4	<b>Etablierung der Methode in weiteren Medien .....</b>	<b>17</b>
3.4.1	Etablierung der Methode im Urin.....	17
3.4.2	Übertragung der Methode auf Zellmedium .....	18
3.4.3	Aufarbeitungsschema zur Messung von Nitrat.....	19
3.5	<b>Quantifizierung der Substanzen.....</b>	<b>20</b>
3.5.1	Eichläufe.....	20
3.5.2	Kontrollserum.....	21

---

<b>3.6</b>	<b>Qualitätssicherung.....</b>	<b>22</b>
3.6.1	Stabilität.....	22
3.6.2	Präzision und Richtigkeit.....	22
3.6.3	Empfindlichkeit.....	23
<b>3.7</b>	<b>Anwendung der etablierten HPLC Methode .....</b>	<b>24</b>
3.7.1	Messung von Nitrat im Serum und Urin bei Patienten mit iNO-Therapie.....	24
3.7.2	Normalwerte - Messung von Nitrat im Serum und Urin bei Kindern ohne iNO-Therapie.....	25
3.7.3	Messung von Nitrat im Zellmedium durch NO-Äquilibrierung in vitro.....	26
<b>3.8</b>	<b>Probanden .....</b>	<b>27</b>
3.8.1	Ethische Aspekte .....	27
3.8.2	Patienten mit iNO-Therapie.....	28
3.8.3	Kontrollen – Patienten ohne iNO-Therapie .....	28
<b>3.9</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Interner Standard.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Ultrafiltration.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Flüssig-flüssig-Extraktion .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Fest-flüssig-Extraktion.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5</b>	<b>Ermittlung des Fraktionsvolumens im Serum .....</b>	<b>33</b>
<b>4.6</b>	<b>Optimierung der Chromatographiebedingungen.....</b>	<b>34</b>
4.6.1	Flowprogramming .....	34
4.6.2	Signaloptimierung .....	35
<b>4.7</b>	<b>Übertragen der Methode auf weitere Medien.....</b>	<b>36</b>
4.7.1	Methode für Nitratmessungen im Urin.....	36
4.7.2	Übertragung der Methode auf Zellmedium .....	37
<b>4.8</b>	<b>Quantifizierung.....</b>	<b>38</b>
4.8.1	Eichung.....	38
4.8.2	Kontrollserum.....	39
<b>4.9</b>	<b>Qualitätssicherung.....</b>	<b>40</b>
4.9.1	Stabilität.....	40
4.9.2	Präzision und Richtigkeit.....	42

---

4.9.3	Empfindlichkeit .....	44
<b>4.10</b>	<b>Anwendung der HPLC-Methode .....</b>	<b>45</b>
4.10.1	Nitrat und Met-Hb im Serum und Urin bei Patienten mit iNO-Therapie (in vivo).....	45
4.10.2	Normalwerte - Nitratkonzentrationen im Serum und Urin bei Patienten ohne iNO-Therapie.....	53
4.10.3	Nitratkonzentrationen im Zellmedium durch in vitro NO-Äquilibration .....	56
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Interner Standard.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Extraktion .....</b>	<b>61</b>
5.2.1	Ultrafiltration.....	61
5.2.2	Flüssig-flüssig-Extraktion .....	61
5.2.3	Flüssig-fest-Extraktion .....	62
<b>5.3</b>	<b>Übertragung der Methode auf andere Medien .....</b>	<b>62</b>
5.3.1	Urin.....	62
5.3.2	Zellmedium.....	62
<b>5.4</b>	<b>Quantifizierung.....</b>	<b>63</b>
<b>5.5</b>	<b>Qualitätssicherung.....</b>	<b>63</b>
<b>5.6</b>	<b>Anwendung der etablierten HPLC Methode .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>81</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ARDS	acute respiratory distress syndrome
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxid Synthase
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
HPLC	high performance liquid chromatography
iNO	inhalatives Stickstoffmonoxid
I.S.	interner Standard
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
Met-Hb	Met-Hämoglobin
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Historischer Hintergrund

Stickstoffmonoxid (NO) hat nicht nur Mediatorfunktionen bei wichtigen biologischen Prozessen im menschlichen Körper, sondern wird auch therapeutisch eingesetzt.

Mitchell konnte 1916 erstmals durch eine an Menschen durchgeführte Studie mit einer nitratarmen Diät feststellen, daß eine endogene Nitratproduktion stattfindet. Es wurde mehr Nitrat ausgeschieden als aufgenommen (Mitchell et al., 1916). Das Interesse am Nitrat versiegte, da eine Nitratproduktion ausschließlich den Darmkeimen zugeschrieben wurde.

Erst in den frühen 80er Jahren haben Tannenbaum und seine Mitarbeiter diese These widerlegt. Sie konnten die extraintestinale Nitratproduktion und deren Bedeutung beweisen (Green et al., 1981). Gleichzeitig zeigten Furchgott und Zawadzki schon 1980 in ihren Forschungsarbeiten, wie essentiell Endothelzellen bzw. von ihnen ausgeschüttete Substanzen für die Vasodilatation an der glatten Gefäßmuskulatur sind (Furchgott et al., 1980). Furchgott bezeichnete diese Substanz als endothelium-derived relaxing factor (EDRF). Sie galt als instabil und konnte u.a. von oxygeniertem Hämoglobin in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Erst sieben Jahre später kam man zu der Erkenntnis, daß EDRF und NO identisch sind (Palmer et al., 1987). Die NO-Synthese und Verstoffwechslung wurden dann bald darauf eingehend auch von Moncada und seiner Arbeitsgruppe untersucht. Es zeigte sich, daß NO aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird und die Quelle für die Nitratproduktion sein muß (Palmer et al., 1988).

Aufgrund seiner biologischen Bedeutung wurde NO von der Zeitschrift Science 1992 zum Molekül des Jahres gekürt (Culotta und Koshland, 1992). 1998 erhielten die amerikanischen Pharmakologen Furchgott, Ignarro und Murad den Nobelpreis für Medizin und Physiologie für ihre Arbeiten über NO (Rabelink, 1998).



## 1.2 NO-Stoffwechsel

### 1.2.1 Synthese und biologische Wirkung des NO

Die Biosynthese des NO ist am besten an den Endothelzellen der Gefäße untersucht (Änggård, 1994). Die Aminosäure L-Arginin wird unter Aufnahme von Sauerstoff zu Guanidino-(N<sup>G</sup>)-hydroxy-L-Arginin oxygeniert. Anschließend folgt eine weitere Oxidation mit Entstehung von L-Citrullin bei gleichzeitigem Freiwerden von NO. Diese Reaktion wird durch eine Isoform der NO-Synthasen (NOS), der sog. konstitutiven NOS (cNOS) katalysiert. Der Prozeß ist von Calmodulin und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) abhängig (Änggård, 1994).

Die Endothelzelle wird z.B. durch Acetylcholin, Bradykinin oder Scherkräfte stimuliert, wodurch mit Hilfe von Calciumionen die cNOS aktiviert werden und die Freisetzung von NO stattfindet. Das NO wiederum aktiviert die lösliche Guanylatcyclase der glatten Muskulatur, was zur Aktivierung von cyclo-Guanosin-Monophosphat führt. Dieses bewirkt schließlich die Relaxation der glatten Muskulatur mit Vasodilatation der Gefäße. Somit ist NO ein wichtiger Faktor für die Blutdruckregulation (Moncada und Higgs, 1993). NO ist für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Blutes von Bedeutung und hemmt die Thrombozytenaggregation und -adhäsion. Die Thrombozyten sind selbst zur NO-Synthese befähigt.

Im Gehirn ist NO in unterschiedlicher Konzentration in allen Arealen des Zentralnervensystems nachweisbar. Es gibt Hinweise für ein Mitwirken bei der Überführung von Informationen aus dem Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis (Moncada und Higgs, 1993). Auch hier sind Calmodulin und calciumabhängige NOS, welche zur Gruppe der cNOS gehören, an der Synthese von NO beteiligt (Troncy et. al., 1997).

Auch bei der körpereigenen Immunabwehr spielt NO eine Rolle. Es ist bekannt, daß aktivierte Makrophagen oder Kupffer'sche Sternzellen NO über den L-Arginin-Mechanismus synthetisieren. NO wirkt auf intra- und extrazelluläre Bakterien mikrobiostatisch, zytotoxisch. Auf Tumorzellen hat es ebenfalls eine zytotoxische Wirkung. Neutrophile Granulozyten scheinen auch NOS zu exprimieren, so daß NO mit unspezifischen Entzündungsmechanismen in Zusammenhang gebracht wird. NO hat nicht nur bei der unspezifischen Immunabwehr eine große Bedeutung, es spielt auch bei der spezifischen Immunabwehr eine noch nicht konkret geklärte Rolle. Hinweise geben die Ausschüttung des Mediators NO

aus Lymphozyten und die supprimierende Wirkung auf die allogene Abstoßung (Moncada und Higgs, 1993).

### **1.2.2 Pathophysiologische Mechanismen und klinische Gesichtspunkte des NO**

Neben der physiologischen Bedeutung von NO und den cNOS, welche nur in geringen Mengen NO synthetisieren, sind auch pathologische Mechanismen bekannt. Eine anhaltende und massive NO-Ausschüttung durch die induzierbaren NOS (iNOS) führt, zur verstärkten Vasodilatation, inadäquater Gewebsperfusion und Blutdruckabfall wie z.B. beim septischen Schock. Cytokine, wie der Tumor Nekrose Faktor, Interferon-gamma sowie Interleukin 1 und bestimmte Bakterienwandtoxine wie Lipopolysaccharide, Lipopeptide gelten als potentielle Stimuli für die iNOS an der Endothelzelle, der glatten Muskulatur der Gefäße, der Makrophagen und in verschiedenen Parenchymzellen (Kirkeboen KA and Strand OA, 1999). Eine vermehrte NO-Synthese durch die iNOS führt im venösen Kapazitätsgefäßsystem zu einem verstärkten Pooling (Vallance und Moncada, 1993). Weiterhin beschreibt Moncada die iNOS-Induktion in Myozyten- und Endokardzellen beim septischen Schock und gibt damit eine mögliche Erklärung für die auftretenden kardialen Dysfunktionen (Vallance und Moncada, 1993) an. Auch in vitro zeigte sich, daß beim septischen Schock die vasokonstriktorischen Mechanismen unwirksam werden und eine starke Vasodilatation resultiert (Moncada und Higgs, 1993). Dieser Effekt konnte durch Glukokortikoide und NO-Inhibitoren verhindert werden (Moncada und Higgs, 1993). In vivo sind bei Patienten mit septischem Schock neben der Standardtherapie zusätzlich NO-Inhibitoren ( $N^G$ -Monomethyl-L-Arginin) in geringer Konzentration verabreicht worden, welche den Blutdruck erhöhen konnten (Petros et al., 1991).

Zur Quantifizierung der NO-Ausschüttung kann die Nitratkonzentration als stabiles Endprodukt in Serum und Urin bestimmt werden. In der Studie von Ochoa wurden bei Patienten mit klinischen Sepsiszeichen und geringem Gefäßwiderstand erhöhte Nitratkonzentrationen im Plasma gemessen (Ochoa et al., 1991). Bei Neugeborenen mit Sepsis wurden Nitratkonzentrationen  $> 200\mu\text{mol/l}$  im Serum gefunden (Shi et al., 1993).

Die beschriebenen Eigenschaften des NO lassen einen klinischen Einsatz auch bei Lungenkrankungen mit pulmonaler Widerstandserhöhung zu. Da NO eine vasodilatative Wir-

kung hat, die bei inhalativer Therapie aber nur in ventilierten Arealen effektiv ist, kommt es selektiv zu einer Verbesserung der Perfusion der ventilierten Bezirke und somit zu einer Reduktion der intrapulmonalen Shunts. Dies wiederum führt zu einer Verbesserung der arteriellen Oxygenierung. Somit gilt inhalatives NO (iNO) als selektiver und potenter pulmonaler Vasodilatator (Demirakca et al., 1996).

Beim persistierenden pulmonalem Hochdruck Neugeborener (PPHN) sind durch inhalative NO-Gaben bis 80ppm die Senkung des pulmonal-arteriellen Druckes und die Verbesserung der Oxygenierung erreicht worden (Roberts et al., 1991; Roberts et al., 1992). Roissant et al. konnten an 10 erwachsenen Patienten mit Acute respiratory distress syndrome (ARDS) zeigen, daß es durch eine iNO-Therapie mit 5-20ppm über einen Zeitraum von 3-53 Tagen zu einer Senkung des pulmonal-arteriellen Druckes kommt und die arterielle Oxygenierung durch Verbesserung der Ventilations/Perfusionsverteilung erhöht wird (Roissant et al., 1993). Bei 17 untersuchten Kindern mit ARDS im Alter von 1 Tag bis 6 Jahren bestätigten sich diese Effekte ebenfalls. Die besten therapeutischen Effekte konnten hier mit 10ppm bei Kindern und 20ppm bei Neugeborenen erzielt werden (Demirakca et al., 1996). Die Parameter des pulmonal-arteriellen Druckes als auch die Oxygenierung sind durch die iNO-Therapie deutlich besser, der Effekt innert kurzer Zeit ist meßbar, aber eine deutliche Senkung der Mortalität scheint im Rahmen der Studien nicht erkennbar zu sein (Troncy et al., 1997, Dellinger et al., 1998)

Eine weitere Indikation von iNO sind Patienten mit angeborenen Herzfehlern, die häufig mit pulmonalem Hochdruck einhergehen. Auch hier können selektive Senkungen des pulmonal vaskulären Widerstandes erreicht werden. Bei pulmonaler Hypertonie wurde eine alterierte Endothelzellfunktion gefunden, die auch nach Herzoperationen mit extrakorporaler Zirkulation nachgewiesen worden ist. Dies bedeutet eine verminderte NO-Ausschüttung und somit einen verminderten vasodilatierenden Effekt von NO (Wessel et al., 1993). Deshalb ist die iNO-Therapie bei Kindern mit prä- oder postoperativ pulmonalem Hochdruck mit Herzfehlern ebenfalls von Bedeutung, was bereits auch an randomisierten, prospektiven, Doppel-blinden plazebo kontrollierten Studien gezeigt werden konnte (Skimming, 1998, Russel et al., 1998). Wobei im Rahmen einer anderen Studie mit 49 beatmungspflichtigen Neugeborenen mit PPHN eine deutliche Besserung der arteriellen Oxygenierung gezeigt werden konnte, eine signifikante Senkung der Mortalität oder der extrakorporalen Membranoxygenation (ECMO) konnte nicht verzeichnet werden (Wessel et al., 1997)

### 1.2.3 NO-Abbau

NO-Halbwertzeiten (HWZ) werden in biologischen Flüssigkeiten mit 10-30s angegeben. Die in dieser Zeit zurücklegbaren Diffusionswege sind 200-600µm (Knowles und Moncada, 1992). Die Abbauwege des NO sind vielfältig und abhängig von der Umgebung, in der es endogen entsteht, exogen eingebracht wird oder in der es wirksam ist.

Als ein wichtiger Inaktivator gilt das Hämoglobin mit einer 3.000 fach höheren Affinität zu NO als zu Sauerstoff (Moncada und Higgs, 1993). Das Hämoglobin wird durch NO zu Met-Hämoglobin (Met-Hb) oxidiert, wodurch das Hämoglobin nicht mehr als Sauerstoffträger fungieren kann. NO bindet weitere Proteine, die als Cofaktor einen Eisenkomplex enthalten, wie z.B. an Myoglobin und Cytochromoxidase mit einem Hämkomplex, oder es bindet an  $\text{Fe}^{2+}$ -S-Komplex enthaltende Proteine wie Glutathion, Cystein oder Albumin. Diese Proteine können NO inaktivieren. Auch kann NO über Superoxidradikale oder Metalloproteine, wie Cytochrom c, Succinat-dehydrogenase, Tyrosinase und Caeruloplasmin inaktiviert werden (Gaston et al., 1994). Den größten Anteil zur Verstoffwechslung von NO übernimmt das Hämoglobin. Das Endprodukt dieser Stoffwechselvorgänge ist instabiles Nitrit, welches sehr schnell in vitro zu Nitrat oxidiert wird (Moncada S. and Higgs A, 1993). Nitrat wird über die Niere mit einer biologischen HWZ von 5-8h ausgeschieden (Änggård, 1994).

## 1.3 Nitrat als quantitativer Indikator von NO

Da NO in vivo nur eine HWZ von wenigen Sekunden hat, ist es schwierig, es selbst zu messen. Es werden daher Stoffwechselzwischen- bzw. Stoffwechselendprodukte als Parameter für die endogene Synthese oder exogene NO-Zufuhr benutzt, wobei Nitrat bzw. Nitrit gemessen werden.

Es gibt eine große Methodenvielfalt zur Nitratbestimmung. Häufig basieren sie auf einem photometrischen Nachweis. Der photometrische Nitrat- bzw. Nitritnachweis beruht oft auf einer Diazotierungsreaktion, sog. Griess Reaktion, deren Mechanismus erstmals von Griess beschrieben wurde (Griess, 1879). Das Nitrit-Ion reagiert mit einem primären aromatischen Amin unter Bildung eines Diazonium-Ions. Durch eine zusätzliche Kupplungsreaktion zwischen diesem und einer weiteren aromatischen Komponente entsteht der rote Azo-

farbstoff, der spektrophotometrisch bei einem Absorptionsmaximum bei 546nm nachgewiesen werden kann. Gebräuchliche Kupplungssysteme sind jedoch wie z.B. das 1-Naphtylamin und 1-Naphtol kanzerogen. Um nicht mit kanzerogenen Stoffen arbeiten zu müssen, wird eher N-(1-Naphtyl-) Aethylendiamin-Dihydrochlorid empfohlen. Von Green et al. wurde erstmals ein automatisiertes Verfahren mittels HPLC (high performance liquid chromatography) zur Messung von Nitrat im Plasma, Serum, Magensaft und Speichel beruhend auf der Griess Reaktion beschrieben (Green et al., 1982). Diese Methode, auch oft in modifizierter Form verwendet, ist einfach und weit verbreitet (Shi et al., 1993; Ochoa et al., 1991; Hegesh und Shiloah, 1982). Zum Zeitpunkt der Methodenetablierung waren uns nur wenige andere chromatographische Methoden zur quantitativen Messung des Nitrates bekannt, wie die ionenchromatographische Bestimmung von Nitrat und Nitrit mittels HPLC und UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 210nm (Böhn et al., 1993; Leone und Kelm, 1996; Michigami et al., 1989) und eine einzige weitere Methode für die simultane Bestimmung von Phosphat, Bromid, Sulphat und Nitrat mittels Ionenchromatographie mit direktem Anschluß eines Leitfähigkeitsdetektors, wobei aber der Schwerpunkt auf der Phosphatmessung liegt, neben anderen Anionen, wie z.B. Nitrat. Aussagekräftige Angaben über die Nitrat-Analyse und Qualitätssicherung konnten nicht gemacht werden (Jong und Burggraaf, 1983).

Die wenigen bisher etablierten Methoden, die auf Basis einer Anionenchromatographie beruhen, sind alle mit einem externen Standard durchgeführt worden.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind keine Angaben über die exogene NO-Zufuhr und deren direkter quantitativer Korrelation zur Nitratkonzentration in vivo bei Kindern mit pulmonaler Hypertonie mittels HPLC beschrieben. Wir haben daher nach einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Nitrat im Serum und gleichzeitig im Urin gesucht, die die Beurteilung der Werte mit und ohne inhalativer NO-Therapie erlaubt, und uns einen Einblick über die Veränderungen in vivo und in vitro gewährt.

## 2 Fragestellung

Es besteht die Aufgabe, eine HPLC-Methode zur Quantifizierung von Nitrat in physiologischen aber auch in pathologischen Bereichen im Serum, Urin und Zellmedium zu entwickeln. Eine präzise und reproduzierbare Nitratmessung in den jeweiligen Medien in vivo und in vitro ist notwendig. Die Nitratkonzentrationen im Serum und Urin werden in vivo bei Patienten mit iNO-Therapie und bei Patienten ohne iNO als sog. Normalwerte gemessen sowie in vitro im Zellmedium durch NO-Äquilibration.

Zur Vereinfachung sollen die Aufarbeitungsweisen zur Messung von Nitrat jeweils auf die verschiedenen Medien übertragbar sein.

Da die Nitratmessungen vorwiegend bei Kindern stattfinden, ist es wichtig, geringe Probenvolumina zu verwenden.

Neben den oben genannten Grundvoraussetzungen zur Etablierung der Methode zur Nitratmessung, sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Wie verhält sich die Nitratbildung im Vergleich zur Met-Hb Bildung in vivo bei Patienten mit pulmonalem Hochdruck und iNO-Therapie ?
- b) Welche Nitratkonzentrationen sind im Serum und Urin bei Patienten ohne iNO zu erwarten, d.h. wie sind die Nitratkonzentrationen im physiologischen Bereich?
- c) Wie verhält sich die Nitratbildung im Vergleich zur Met-Hb Bildung in vitro bei NO-Äquilibration der Erythrozytensuspension ?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

##### Materialien

HPLC Pumpe [Waters, Eschborn, Deutschland]

WISP 710 Autosampler [Waters, Eschborn, Deutschland]

Leitfähigkeitsdetektor 432 [Waters, Eschborn, Deutschland]

Säule IC-Pak A HC [Waters, Eschborn, Deutschland]

Vorsäule [Waters, Eschborn, Deutschland]

Rechner 2.86 [IBM]

Chromatographiesoftware Maxima 820 [Waters, Eschborn, Deutschland]

0.22µm Durapore Membran [Waters, Eschborn, Deutschland]

Reinstwasser Anlage Milli Q RF Plus [Millipore, Waters, Eschborn, Deutschland]

Sep-Pak Cartridge [Millipore, Waters, Eschborn, Deutschland]

Ultrafilter Centrisart [Sartorius, Göttingen, Deutschland]

Ultrafree MC Filter [Millipore, Waters, Eschborn, Deutschland]

Zentrifuge mit Winkelrotor [Hettich]

Oxymeter [Ciba Corning 278 Blut-Gas-System, Frankfurt, Deutschland]

Drug Free Serum [Ciba Corning, Frankfurt, Deutschland]

Kontrollserum Precinorm U Universalkontrollserum [Boehringer, Mannheim, Deutschland]

Alle nachfolgend aufgeführten Chemikalien werden von der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen:

Acetonitril, Borsäure, Butanol, Glyzerol, Natriumtetraborat-decahydrat, Natriumgluconat, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Ethylacetat, Isopropanol, Hanks Puffer, Natriumbicarbonat, Natriumbisulfid, Nitrat Standard, Natriumchlorat, Standard I ( $F^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $Br^-$ ), Standard II ( $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ), DMEM/F12 (1:1) Medium [Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12, Gibco BRL, Life Technologies, U.K.]

**Probenmaterial**

Die Probenvolumina sind konstant 300µl.

Serum

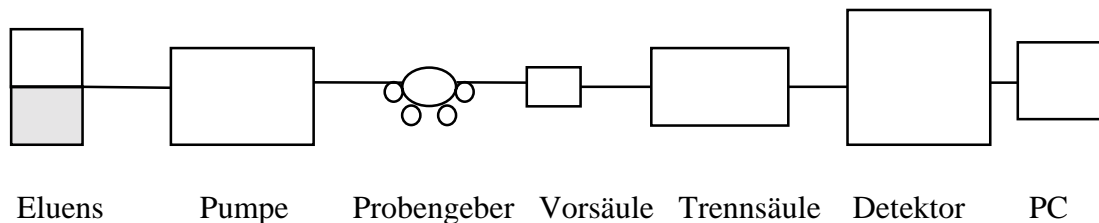
Urin (1:3 mit Reinstwasser)

Erythrozyten im Zellmedium (Erythrozytensuspension)



### 3.1.2 Apparativer Aufbau eines HPLC Systems

Die Chromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, das auf der Verteilung des zu trennenden Gemisches zwischen einer mobilen und stationären Phase beruht.



**Abbildung 1: Apparativer Aufbau eines HPLC Systems**

Das HPLC-System besteht aus folgenden Bauteilen: HPLC Pumpe, automatischem Probengeber, Vorsäule, Trennsäule (stationäre Phase), Detektor und PC-Meßwertverarbeitung. Mit Hilfe der Pumpe wird die mobile Phase (Eluens) mit hohen Drücken durch die HPLC Apparatur gefördert. Die Pumpe reguliert die konstante Fließgeschwindigkeit. Am Probengeber gelangen die Proben über eine Injektionsnadel automatisch in den Eluentenstrom. Vor der eigentlichen Trennsäule ist eine Vorsäule geschaltet. Die Trennsäule wird so vor chemischer Verschmutzung geschützt, und die Gebrauchsdauer der Hauptsäule verlängert sich (Unger, 1998). Die Trennsäule ist das Herzstück der HPLC Anlage. Wir haben eine Anionenaustauschersäule eingesetzt. Die Abmessung der Säule ist 150mm x 4,6mm mit einer Partikelgröße von 10µm und einer Kapazität von ca. 30µeq/ml. Das Packungsmaterial ist ein synthetisch vernetztes Polymethacrylat-Harz mit Trimethylammonium-Gruppen. Die Auftrennung der geladenen Teilchen kommt durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der stationären Phase zustande. Das Ausmaß der Retention richtet sich nach Bindungsaffinität der Probenanionen mit der Austauscherfunktion (Unger, 1998). Faktoren wie kleiner Ionenradius, größere Polarisierbarkeit, größere Elektronegativität, geringere Wechselwirkung mit dem Eluens erhöhen die Retention (Heisz, 1987).

Detektoren sind Instrumente, die das Ausströmen der einzelnen Probenkomponenten aus der Säule erfassen und in elektrische Signale umwandeln. Der Leitfähigkeitsdetektor wird in der Regel in der Ionenchromatographie zum Nachweis eluierter Ionenspezies verwendet. Die Messung der elektrolytischen Leitfähigkeit beruht auf der Wanderung der Ionen in einem elektrischen Feld konstanter Spannung, hervorgerufen durch zwei Elektroden. Die

Kationen oder Anionen tragen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration  $c$  und ihrer Beweglichkeit  $I_i$  zur direkt meßbaren elektrolytischen Leitfähigkeit  $\chi$  (Siemens/cm) bei (Heisz, 1987). Die elektrolytische Leitfähigkeit wird wie folgt berechnet:

$$\chi = (I_{i+} + I_{i-}) \times c \times 10^{-3}$$

Da die Beweglichkeit der Ionen temperaturabhängig ist, ist eine automatische Temperaturskompensation notwendig. In unserem System wurde eine konstante Temperatur von 37°C festgelegt.

In der Säulentechnik ist eine niedrige Grundleitfähigkeit durch schwache Eluentskonzentrationen anzuwenden (Eppert, 1997). Bei der gewählten Methode besteht in Abhängigkeit von der mobilen Phase eine Untergrundleitfähigkeit von 270µSiemens, die als Nulllinie angesehen wird. In Bezug auf diese Baseline erscheinen die Probenanionen als ein positives oder negatives Signal (Eppert, 1997).

Am PC werden diese Signale zur Identifikation und Zuordnung von chromatographischen Peaks bildlich dargestellt und mittels Integration der Peak Flächen werden die Konzentrationen der Probenkomponenten quantitativ ausgewertet.

## 3.2 Herstellung der Standards

### 3.2.1 Nitratarbeitslösung (Spike)

Das Molekulargewicht von Nitrat ist 62,02. Eine kommerziell erhältliche Nitratstammlösung enthält 1,00g Nitrat in einem Liter. Aus dieser Nitratstammlösung wird eine Nitratarbeitslösung (Spike) hergestellt, indem 372µl Nitratstammlösung zu 10,0ml Aqua bidest. gegeben werden. Von dieser Nitratarbeitslösung werden 100µl zu 300µl Matrix pipettiert, um eine 200µmol/l Nitratlösung zu erhalten. Die Richtigkeit der Nitratarbeitslösung wird kontrolliert, indem genau 1,371g/l Natriumnitrat eingewogen werden, um wiederum eine Endkonzentration von 200µmol/l zu erhalten.

### 3.2.2 Interner Standard

Als interner Standard werden Chlorat-Ionen verwendet. Das Massengewicht von Natriumchlorat ist 106,44. In der Gebrauchslösung sind 1,41 mmol Natriumchlorat pro l enthalten. Eine 1,0 ml Lösung enthält 366,33 nmol Chlorat-Ionen. Es werden jeweils 100µl interner Standard zu 300µl Proben pipettiert.

### 3.2.3 Mobile Phase (Eluens)

Eine isokratische Elution wird bei dieser Chromatographie verwendet. Für das Eluens wird zunächst ein 1 Liter Borat/Gluconatkonzentrat hergestellt. Hierfür werden 16g Natriumgluconat, 18g Borsäure, 25g Natriumtetraborat/decahydrat, 250ml Glyzerol ad 1000ml Reinstwasser benötigt. Zur Herstellung von 1l Eluens werden 20ml Butanol auf 1000ml Reinstwasser gegeben. Das Eluens wird mit Unterdruck durch eine 0,22µm Durapore Membran gefiltert. Das Eluens hat einen konstanten pH-Wert von 8,5.

## 3.3 Etablierung der Methode für Serum

### 3.3.1 Interner Standard

Der interne Standard ist eine Substanz mit bekannter chemischer Zusammensetzung und hoher Reinheit, die für die quantitative Bestimmung von Probenkomponenten in einem Probengemisch dient. Eine definierte Menge des internen Standards wird der quantitativ zu analysierenden Probe zugefügt und gut vermischt. Dadurch stehen die gesuchte Substanz und der interne Standard immer in einem bestimmten Verhältnis. Der interne Standard wird der Probenmischung im ersten Arbeitsschritt zugesetzt, so daß Fehler, die bei der Probenaufbereitung, der Dosierung und der Chromatographie auftreten, ausgeschaltet werden. Die Verwendung eines internen Standards bietet den Vorteil, daß die eingespritzte Probenmenge nicht genau bekannt oder wiederholbar zu sein braucht. Bei der hier verwendeten quantitativen Auswertung kommt es nur auf das Flächenverhältnis von internem

Standard und Probenkomponente an. Dieses Verhältnis ist sowohl von der Probenmenge als auch von der Detektorempfindlichkeit unabhängig (Unger, 1989, Heisz, 1987).

Es werden folgende Anforderungen an den internen Standard gestellt (Unger, 1989):

- geringe Retentionszeitdifferenzen in Nähe des Analyten
- ähnliche Konzentrationen und Substanzeigenschaften
- nicht in der ursprünglichen Probe vorhanden
- muß an einer freien Stelle der Chromatographie erscheinen

Folgende Anionen wurden auf ihre Eignung als interner Standard geprüft:

Arsenat, Azid, Bisulfit, Bromat, Chlorat, Chromat, Cyanid, Hexacyanoferrat, Molybdat, Thiocyanat, Thiosulfat, Wolframat.

Die Einwaage der Reinsubstanzen betrug 10mg/10ml Stammlösungen. Je 100µl Stammlösung wurden mit 300µl Reinstwasser zur Ermittlung eines geeigneten Standards chromatographiert.

### **3.3.2 Ultrafiltration**

Getestet wurden das MC Ultrafree und der Ultrafilter Centrisart. Die Ultrafiltrationssysteme wurden vorerst auf Nitratkontamination überprüft, indem sie mit Reinstwasser zentrifugiert und auf die Chromatographie gegeben wurden. Parallel gab man direkt das Reinstwasser in die Probengläschen zur Chromatographie, damit eine mögliche Nitratkontamination von der Gläschenwand ausgeschlossen werden konnte.

Die Ultrafiltration wurde zur Proteinabtrennung aus dem Serum herangezogen. Das Ultrazentrifugationssystem, die Ultrazentrifugationszeit und die nötige Umdrehungszahl wurden jeweils mit 300µl Serum und 100µl internem Standard ermittelt.

Die Probe wurde in die Ultrafiltrationseinheit MC Ultrafree gegeben. Sie hat ein maximales Fassungsvermögen von 400µl mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 Dalton. Bei 4.000, 7.000, 10.000 und 14.000Upm wurde die Menge des Ultrafiltrats nach 30 und 60min be-

stimmt. Die Ultrafilter Centrisart mit einem max. Fassungsvermögen von 1ml haben eine Ausschlußgrenze von 10.000 Dalton. Bei einer Umdrehungszahl von 4.800Upm wurde das Volumen des Ultrafiltrats nach 15min, 30min, 45min, 60min erfaßt, um die optimale Zentrifugationszeit zu bestimmen.

### **3.3.3 Flüssig-flüssig-Extraktion**

Nach der Ultrafiltration des Serums mit Centrisart bei 4.800Upm war keine erfolgreiche Chromatographie möglich, so daß mit einer Flüssig-flüssig-Extraktion versucht wurde, die störenden Substanzen in der Chromatographie zu minimieren. Zur Extraktion sind jeweils 600µl Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat, Diethylether eingesetzt worden. Nach Gewinnung des Ultrafiltrats aus einem 1,5ml Serumpool und 500µl internem Standard wurden die Lösungsmittel jeweils zugegeben und anschließend für 20min auf den Rotationsmischer gebracht. Danach ist das Gemisch für 5min zentrifugiert worden, wobei es hierbei zu einer Phasentrennung kam. Die eingesetzten Extraktionsmittel werden verworfen. Die Proben wurden bei 45°C für 10min im Stickstoffstrom von Lösungsmittelresten befreit. Anschließend sind die Proben chromatographiert worden.

### **3.3.4 Fest-flüssig-Extraktion**

#### **3.3.4.1 Sep-Pak-Sorten**

Sep-Pak-Kartuschen verhalten sich wie chromatographische Säulen. Die Sep-Pak-Sorten sind mit verschiedenen Substanzen gepackt und können abhängig von ihren chemischen Eigenschaften Stoffe zurückhalten.

In der Tabelle sind die funktionellen Gruppen der bindenden Matrix in den einzelnen Sep-Pak-Kartuschen dargestellt:

**Tabelle 1: Funktionelle und organische Si-C-Gruppe der Sep-Pak-Sorten**

Packungsmaterial	Funktionelle Gruppe	organische Si-C Gruppe
C <sub>18</sub>	Octadecyl	- Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>
NH <sub>2</sub>	Amino	- Si(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>
CN	Cyano	- Si(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CN
Diol	Diol	- Si(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH
Accell plus QMA	Quart. Ammoniumgruppe	- C(O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>

Folgende Sep-Pak-Sorten: sind auf ihre Eignung geprüft worden: Silica, Alumina A, Alumina B, Alumina N, NH<sub>2</sub>, Diol plus, Florisil, C18 light, CN plus, Accell plus QMA light.

Alle Sep-Pak-Sorten wurden vor Aufbringung der Probensubstanz mit 5ml Isopropanol und 5ml Reinstwasser konditioniert. Für die Fest-flüssig-Extraktion wurden pro Probe folgende Materialien verwendet: 300µl Serum, 100µl interner Standard, Ultrafilter Centrisart und die jeweilige Sep-Pak-Sorten. Nach einer Ultrafiltration von 15min bei 4800Upm wurde das 270µl Ultrafiltrats mit Reinstwasser über die einzelnen Sep-Pak eluiert. Es wurden 600µl aufgefangen und zunächst mit einem Injektionsvolumen von 50µl auf die Chromatographie gegeben. Die einzelnen Chromatographie wurden ausgewertet und beurteilt. Die Chromatographiezeit betrug vorerst 40min.

Eine befriedigende Chromatographie ist allein mit dem Sep-Pak C18 light möglich. Im folgenden wurde nur noch mit Sep-Pak C18 light weitergearbeitet.

### 3.3.5 Ermittlung des Auffangvolumens

Nach Ultrazentrifugation und Entfernung von Interferenzen aus der Probenmatrix mittels des Sep-Pak C18 light, wurde das Auffangvolumen der zu eluierenden Substanz bestimmt. Das optimale Auffangvolumen, in dem interner Standard und Nitrat aus dem Sep-Pak C18 light eluiert werden konnten, sollte durch Fraktionieren der Probe und anschließender chromatographischer Aufzeichnung zur Beurteilung der Peaks ermittelt werden. Das Eluat wurde in fünf 110µl Einheiten fraktioniert. Dies geschah mit einer bekannt zugesetzten Nitratkonzentration in Reinstwasser und im Precinorm Kontrollserum.

### **3.3.6 Einstellung der optimalen Chromatographiebedingungen**

#### **3.3.6.1 Flowprogramming**

Es wurden Durchflußgeschwindigkeiten von 1,2-2,0ml/min getestet und die Retentionszeiten miteinander verglichen.

#### **3.3.6.2 Signalkorrektur**

Es fand eine Umschaltung des „Outputs“ am Leitfähigkeitsdetektor von 10 $\mu$ S/1V auf 100 $\mu$ S/1V statt.

#### **3.3.6.3 Laufzeit**

Die Chromatographielaufzeiten ergeben sich aus der Durchflußgeschwindigkeit und den Retentionszeiten der Anionen.

## **3.4 Etablierung der Methode in weiteren Medien**

Im folgenden wurde versucht, die Methode auf Urinproben und Erythrozyten im Zellmedium, zu übertragen. Der interne Standard und das Probenvolumen sollten nicht verändert werden.

### **3.4.1 Etablierung der Methode im Urin**

#### **3.4.1.1 Probenvorbereitung**

Die Urinstammprobe bestand aus gepooltem Urin. Da mit einer noch unbekannten Matrix gearbeitet wurde, verdünnten wir den gepoolten Urin auf 1:10 mit Reinstwasser zu einem sog. Arbeitsurin. Zu 300µl Arbeitsurin wurden 100µl interner Standard pipettiert. Die Arbeitsurine wurden bei 14.000Upm 5min zur Sedimentation zentrifugiert. Proben- und interne Standard-Volumina wurden nicht verändert, wodurch die wäßrige Eichung zur Quantifizierung der Nitratkonzentration im Serum auch für die Urinproben verwendet werden konnten.

#### **3.4.1.2 Interner Standard**

Zur Überprüfung der Brauchbarkeit des internen Standards sind folgende Proben aufgegeben worden: 300µl Arbeitsurin ad 400µl Reinstwasser sowie 300µl Arbeitsurin und 100µl internem Standard.

#### **3.4.1.3 Optimale Verdünnungsstufe**

Die optimale Verdünnungsstufe der Urinproben ist anhand einer Verdünnungsreihe aus der Urinstammprobe festgelegt worden. Mit folgenden Verdünnungen wurde gearbeitet: 1:2, 1:3, 1:5 und 1:10. Die bei den Verdünnungen ermittelten Konzentrationen müssen dabei



linear verlaufen. Die Proben sind mit einem Injektionsvolumen von 100µl aufgegeben worden.

#### **3.4.1.4 Optimierung der Nitratmessung im Urin**

Es wurde geprüft, ob die direkte Injektion der Urinproben zuverlässig ist oder eine aufwendigere Sep-Pak-Aufarbeitung vorgenommen werden muß.

Dazu wurden 30 verschiedene Urinproben in doppeltem Ansatz 1:3 verdünnt. Von diesen Arbeitsurinen wurde eine 300µl Probe direkt auf die Chromatographie gegeben und die andere entsprechend der Serum Methode aufgearbeitet und dann chromatographiert.

### **3.4.2 Übertragung der Methode auf Zellmedium**

Die Aufarbeitung von Erythrozyten im Zellmedium zur Messung von Nitrat sollte nach der entwickelten Nitrat-im-Serum-Methode durchgeführt werden. Als Kontrolle wurde ein mit 200µM Nitrat versetztes Zellmedium verwendet.

#### **3.4.2.1 Interner Standard**

Zur Überprüfung der Brauchbarkeit des internen Standards wurden folgende Proben aufgegeben: 300µl Zellmedium ad 400µl mit Reinstwasser aufgefüllt sowie 300µl Zellmedium mit 100µl internem Standard.

#### **3.4.2.2 Aufarbeitung**

Die Nitratmessungen im Zellmedium erfolgten nach der beschriebenen Nitrat-im-Serum-Methode.

### 3.4.3 Aufarbeitungsschema zur Messung von Nitrat

Aus den durchgeführten Versuchen ergibt sich zusammenfassend folgende Aufarbeitungsweise in den verschiedenen Matrices:

#### Probenvorgabe

300µl Serum

300µl Zellmedium nach NO Äquilibration 100µl Urin

ad 300µl Reinstwasser

100µl interner Standard

100µl interner Standard

#### Ultrazentrifugation

4.800Upm

4.800Upm

15min

5min

200µl Zentrifugat gelangen zur Weiterverarbeitung

#### Konditionierung

Sep-Pak C18 light wurde mit 5ml Isopropanol und 5ml Reinstwasser mit 3ml/min konditioniert.

#### Elution

Das Probenmaterial wird in die Sep-Pak Kartusche gegeben. Durch Nachdrücken mit Reinstwasser werden die ersten 100µl Eluat verworfen und die nächsten 330µl aufgefangen.

#### Probenaufgabe in das HPLC System

Zur Bestimmung von Nitrat werden die Proben mit einem Injektionsvolumen von 100µl in das System gegeben bei einer Laufzeit von 25min und einer max. Durchflußrate von 2,0ml/min.

#### **Abbildung 2: Aufarbeitungsschema**

## 3.5 Quantifizierung der Substanzen

### 3.5.1 Eichläufe

Die Erstellung der Eichkurven erfolgt, indem die Eichmischungen mit verschiedenen Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen sowie mit bekannt konstanten Konzentrationen des internen Standards chromatographiert werden. Es wird das Verhältnis der Peakfläche der zu bestimmenden Substanz zur Fläche des internen Standards erstellt und als Funktion der Konzentration des gesuchten Analyten aufgetragen.

Für die Erstellung der Eichkurve werden 7 Eichwerte mit Nitratkonzentrationen von 50µM bis 800µM verwendet. Die einzelnen Eichläufe setzen sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Eichproben**

Nitrat Eichwerte [µmol/l]	50	100	200	300	400	600	800
Nitrat - Spike [µl]	25	50	100	150	200	300	400
Interner Standard [µl]	100	100	100	100	100	100	100
Aquabidest [µl]	275	250	200	150	100	0	0

Die Eichung findet ohne Aufarbeitung in rein wässrigem Milieu statt. Eine rein wässrige über Sep-Pak eluierte Eichung und eine Serum Sep-Pak Eichung wurden zusätzlich erstellt und verglichen.

### 3.5.2 Kontrollserum

Die Zusammensetzung der Kontrollproben sollte den Patientenproben so ähnlich wie möglich sein. Zu den Retentionszeiten des internen Standards und des zu erwartenden Nitrat-Peaks muß das Kontrollserum frei von störenden Einflüssen sein. Zur Auswahl standen lyophilisierte Kontrollseren wie das Drug Free Corning und das Precinorm.

Zur Verwendbarkeit der Kontrollseren Drug Free und Precinorm wurden jeweils folgende Proben angesetzt: 300µl Blank-Kontrollserum und 100µl Reinstwasser, 300µl Blank-Kontrollserum und 100µl interner Standard sowie 300µl Kontrollserum mit 200µM Nitrat und 100µl interner Standard.

Anhand der Chromatographie konnte das geeignete Serum ausgewählt und das Kontrollserum hergestellt werden. Im folgenden wurde nur noch mit dem Precinorm Kontrollserum gearbeitet. Es dient als biologische Matrix, die mit der reinen Substanz Nitrat bekannter Konzentration aufgestockt wurde: Aus der 1,00g pro 1l Nitratstammlösung wurde eine Nitratarbeitslösung mit 372,12µl Nitratstammlösung ad 10ml Reinstwasser hergestellt. Dann wurden 1,372ml Nitrat-Gebrauchslösung ad 30,0ml Precinorm Kontrollserum gegeben. Die 200µM Nitrat Precinorm Kontrollseren à 300 µl sind bei -40°C eingefroren worden. Parallel zu jeder Patientenserumprobe wurden diese mit aufgearbeitet.

## **3.6 Qualitätssicherung**

### **3.6.1 Stabilität**

#### **Serum**

Gepoolte auf 53 $\mu$ M und 308M Nitrat versetzte Serumproben wurden verwendet. Eine Einfachaufarbeitung der beiden Serumproben über 5 Tage bzw. über 5 Wochen 1 mal wöchentlich fand statt. Die Proben wurden über 5 Tage bei 4°C im Kühlschrank bzw. über 5 Wochen bei –40°C gelagert.

#### **Urin**

Gepoolte auf 127 $\mu$ M und 329 $\mu$ M Nitrat versetzte Urinproben wurden verwendet. Eine Einfachaufarbeitung der beiden gepoolten Urinproben über 5 Tage bzw. über 5 Wochen 1 mal wöchentlich fand statt. Die Proben wurden über 5 Tage bei 4°C im Kühlschrank bzw. über 5 Wochen bei –40°C gelagert.

### **3.6.2 Präzision und Richtigkeit**

#### **3.6.2.1 Präzision von Tag zu Tag (inter assay) im Serum**

Das gepoolte auf 220 $\mu$ M Nitrat versetzte Serum wurde an 10 aufeinander folgenden Arbeitstagen entsprechend aufgearbeitet und chromatographiert. Die einzelnen Proben wurden bei -40 C gelagert.

#### **3.6.2.2 Präzision in der Serie (intra assay) und Richtigkeit im Serum**

Für die Aufarbeitung von jeweils 10 Proben wurden Precinorm Stammlösungen in einer Nitratkonzentration von 100 $\mu$ M und 300 $\mu$ M hergestellt, jeweils in ununterbrochener Serie aufgearbeitet und chromatographiert zur Ermittlung der Präzision und die Richtigkeit der Methode zur Nitratmessung bestimmt (rel. Fehler: 100 x (Messwert-Sollwert)/ Sollwert).

### **3.6.2.3 Präzision in der Serie (intra assay) im Urin**

Gepoolte auf 363 $\mu$ M Nitrat versetzte Urinproben sind in ununterbrochener Serie unter identischen Bedingungen direkt injiziert und chromatographiert worden.

### **3.6.3 Empfindlichkeit**

Precinorm Seren mit Sollkonzentrationen von 5, 10, 20, 30, 36 und 50 $\mu$ M Nitrat sind jeweils in Serie fünffach aufgearbeitet worden.

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der Methode wurden Precinorm Seren mit den Konzentrationen 5, 10, 20, 30, 36, 50 $\mu$ M Nitrat hergestellt und jeweils 5 mal aufgearbeitet.

### **3.7 Anwendung der etablierten HPLC Methode**

#### **3.7.1 Messung von Nitrat im Serum und Urin bei Patienten mit iNO-Therapie**

Die inhalative NO-Therapie wird zur Behandlung des pulmonalen Hochdrucks bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern vor und nach Herzoperationen eingesetzt. Anhand dieses Patientengutes sollten die sich durch NO-Gabe ändernden Nitratkonzentrationen im Serum und Urin ermittelt werden.

Neben der konventionellen Therapie des postoperativen pulmonalen Hochdruck wurde die NO-Inhalation in der ersten Stunde standardisiert mit 20ppm und im Verlauf nach individueller Notwendigkeit eingesetzt. Diese bewegte sich während der 24h iNO Gabe zwischen  $m=15 - 30$ ppm, wobei keine höheren Konzentrationen als 40ppm eingesetzt wurden. Es wurden 1ml arterielles Blut und 1ml Urin bei 7 iNO Patienten zu folgenden Zeitpunkten entnommen: vor iNO-Gabe, 1h nach Beginn der iNO-Gabe (1h w NO), 24h nach Beginn der iNO-Gabe (24h w NO) sowie 24h, 48h und 72h nach Absetzen der iNO Belastung (24h, 48h, 72h n NO). Begleitend zu jedem Abnahmezeitpunkt wurde der Met-Hb Spiegel über das Oxymeter bestimmt. Laborwerte wie CRP, Leukozyten, Harnstoff, Kreatinin wurden zu Beginn der NO-Inhalation dokumentiert.

##### **3.7.1.1 Probenvorbereitung**

Das Vollblut wird abesert bei 14.000Upm 5min. Zur Sedimentation fester Bestandteile wird mit dem Urin ebenso verfahren.

Die Proben werden direkt aufgearbeitet oder bei  $-40^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Aufarbeitung entspricht der bereits geschilderten Vorgehensweise bei Serum bzw. Urin.

### **3.7.2 Normalwerte - Messung von Nitrat im Serum und Urin bei Kindern ohne iNO-Therapie**

#### **3.7.2.1 Serum**

Den ambulanten Patienten (n=27) wurde 1ml Blut abgenommen und mit der üblichen HPLC-Methode eine Nitratmessung durchgeführt. Fand keine unmittelbare Nitrat-Analyse im Anschluß an die Probengewinnung statt, wurde die Probe sofort bei -40°C eingefroren. Es wurden die Nitratkonzentrationen ermittelt und getestet, ob eine Abhängigkeit von Alter und Geschlecht besteht.

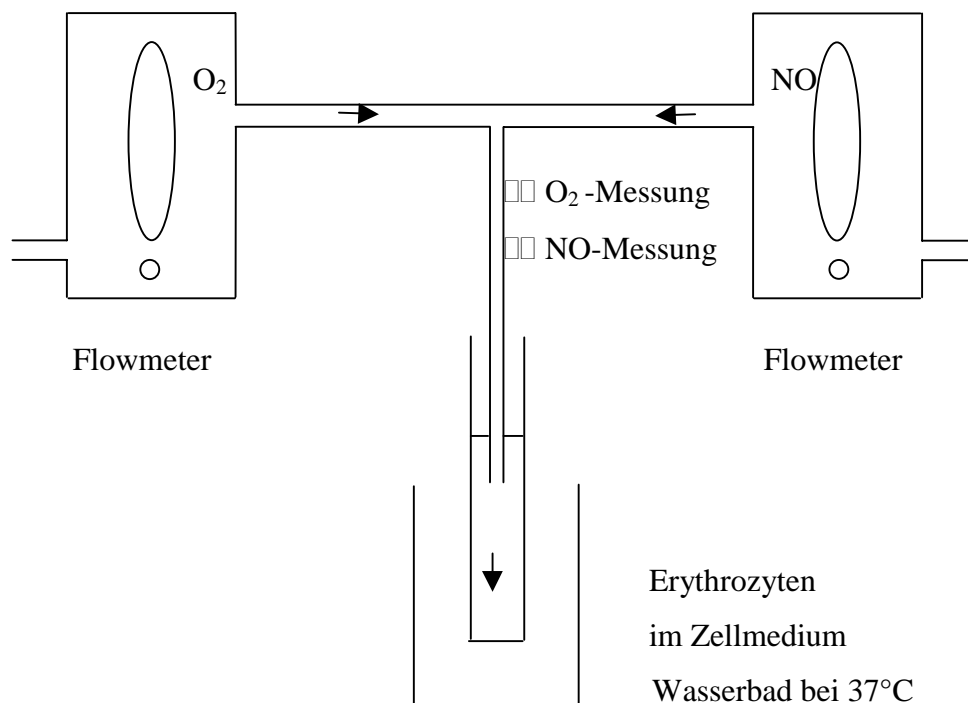
#### **3.7.2.2 Urin**

Die Nitratkonzentrationen im Urin wurden bei ambulanten Patienten (n=10) der Kinderpoliklinik gemessen. Konnte die Probe nicht am gleichen Tag aufgearbeitet werden, so wurde sie bei -40°C eingefroren.



### 3.7.3 Messung von Nitrat im Zellmedium durch NO-Äquilibration *in vitro*

25ml Erythrozytenkonzentrat wurde mit 4,45 mM Na<sub>2</sub>EDTA antikoagulierte, und die Erythrozyten wurden 2 mal 6min bei 1.500Upm mit Hanks Puffer ad 50ml gewaschen. Der jeweilige Überstand wurde verworfen. Eine Einstellung des Hämatokrits auf  $0,30 \pm 0,02$  erhielten wir durch Suspension der Erythrozyten in 1/3 DMEM/F/12 (1:1) Zellmedium und 2/3 Hanks Puffer. Diese Stammlösung wurde in vier 5ml-Proben aufgeteilt, und diese wurden gleichzeitig mit NO äquilibriert.



#### Abbildung 3: Versuchsaufbau zur *in vitro* Äquilibration

Die Inkubation erfolgt als 80% NO und 20% Sauerstoff (O<sub>2</sub>) Gasgemisch. Um den Leerwert (NO 0ppm) zu ermitteln, d.h. die Nitratkonzentration *in vitro* ohne NO-Äquilibration, wurde ein Gasgemisch von 80% Stickstoffdioxid und 20% O<sub>2</sub> zur Äquilibration eingesetzt.

Den Proben wurden 115µl Bicarbonat hinzugefügt, um den pH-Wert von 7,35–7,45 konstant zu halten.

Bei der Versuchsdurchführung wurde eine konstante Temperatur von 37°C durch das Thermostat eingestellt.

### **3.7.3.1 NO-Äquilibration**

Zur adäquaten Oxygenierung der Erythrozytensuspension wurde diese mit 100% O<sub>2</sub> für ca. 10min inkubiert, damit sich eine Sättigung von 96-99% O<sub>2</sub> in der Suspension einstellte (t=0). Danach fand die NO-Äquilibration jeweils für 90min bei den Konzentrationen 0ppm (Leerwert), 18ppm, 32ppm, 80ppm NO statt.

### **3.7.3.2 Nitrat und Met-Hb Bestimmung im Zellmedium**

Eine spektralphotometrische Met-Hb Bestimmung und Abnahme von 1ml Zellsuspension zur Ermittlung der Nitratkonzentration unter der NO-Äquilibration fand zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 90min statt. Das Prinzip des spektralphotometrischen Verfahrens besteht in der Messung der Hb bzw. Met-Hb-Konzentration über die Extinktionsmessung mit monochromatischem Licht.

Die 1ml Probe wurde bei 14.000Upm 5min zentrifugiert damit die Erythrozyten sedimentieren. Der Überstand welcher sich aus 1/3 DMEM/F12 (1:1) Zellmedium und 2/3 Hanks Puffer zusammensetzt und als „Zellmedium“ bezeichnet ist, wurde entsprechend der Nitrat-im-Serum-Methode aufgearbeitet und chromatographiert. Als Kontrolle wurde eine auf 200µM Nitrat aufgespikte Lösung aus 1/3 DMEM Zellmedium und 2/3 Hanks Puffer verwendet.

## **3.8 Probanden**

### **3.8.1 Ethische Aspekte**

Die Bestimmung der Nitratkonzentrationen in Serum und Urin der iNO-Patienten ist im Rahmen einer Studie in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki mit ihren Erweiterungen (Tokyo 1975, Venedig 1983, Hong Kong 1998) durchgeführt worden. Die Zustimmung des ethischen Komitees in Gießen ist dabei eingeholt worden.

### **3.8.2 Patienten mit iNO-Therapie**

Die Stichprobe der iNO-Patienten ist  $n=7$ . Die Patienten sind im Alter von 0,5 bis 4,25 Jahren. Alle Patienten haben einen angeborenen Herzfehler mit pulmonalem Hochdruck.

Patienten mit Sepsis oder Infektion wurden ausgeschlossen, da diese Faktoren eine Erhöhung der Nitratkonzentration im Urin oder Serum bewirken können. Entzündungszeichen wie CRP und Leukozyten sowie Befunde von Urinstatus sind als Parameter für den Ausschluß erhoben worden.

Die Patienten haben während des untersuchten Zeitraums kein Nitroglyzerin oder andere Medikamente, die als NO-Donatoren bekannt sind, erhalten.

Die einzelnen Patienten mit Geburtsdatum, Alter, Geschlecht, Gewicht, Länge, o.g. Laborparameter sowie die Urinausscheidung sind im Anhang aufgelistet.

### **3.8.3 Kontrollen – Patienten ohne iNO-Therapie**

Zur Ermittlung von Normalwerten im Serum wurde eine Stichprobe aus 27 ambulanten Patienten ( $m=17$ ,  $w=10$ ) im Alter von 1 bis 18 Jahren herangezogen. Die Patienten hatten keinen akuten Infekt und keine Medikamente erhalten, die als NO-Donatoren bekannt sind.

Zur Ermittlung von Normalwerten im Urin wurde eine Stichprobe aus 10 ambulanten Patienten ( $m=5$ ,  $w=5$ ) im Alter von 0,5–15 Jahren erhoben. Die Patienten haben keine Medikamente erhalten, die als NO-Donatoren bekannt sind, und sie hatten keinen akuten Harnwegsinfekt. Die Leukozytenzahlen im Urinstatus waren stets  $\leq 5$  Leukozyten, und es waren keine Bakterien nachweisbar.

### 3.9 Statistische Methoden

Die ermittelten Daten werden als Absolutwerte dargestellt. Zusammenfassend werden Mittelwerte ( $m$ )  $\pm$  Standardabweichungen ( $s$ ) angegeben und bei der Qualitätssicherung zusätzlich der Variationskoeffizient (VK) berechnet und die Richtigkeit in % angegeben (rel. Fehler =  $100 \times (\text{Messwert} - \text{Sollwert} / \text{Sollwert})$ ). Zur Verdeutlichung eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen werden der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) bzw. das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) berechnet sowie Punktwolken mit Regressionsgeraden erstellt. Zur Darstellung von Häufigkeitsverteilungen werden Boxplots angewendet. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Test nach Kolmogoroff-Smirnov. Bei der in vitro Äquilibration wurde der t-Test für paarige Stichproben verwendet. Die Signifikanz der Differenz der Mittelwerte der Nitratkonzentrationen durch iNO im Serum und Urin wurde nach dem Wilcoxon Test für Paardifferenzen, wenn keine Normalverteilung und paarige Stichproben vorlagen, berechnet. Die Hypothese, daß kein Unterschied zwischen den beiden Methoden zur Messung von Nitrat im Urin besteht, wurde im Rahmen einer graphischen Darstellung nach Bland und Altman belegt und ebenfalls nach dem Wilcoxon Test für Paardifferenzen berechnet.

Um die Abhängigkeit zweier Merkmale (Alter und Geschlecht) von der Nitratkonzentration gleichzeitig zu testen wird die Covarianzanalyse durchgeführt (Sachs, 1992; Altman und Bland, 1983; Bland und Altman, 1986). Alle Hypothesen wurden auf dem 5%-Niveau getestet.

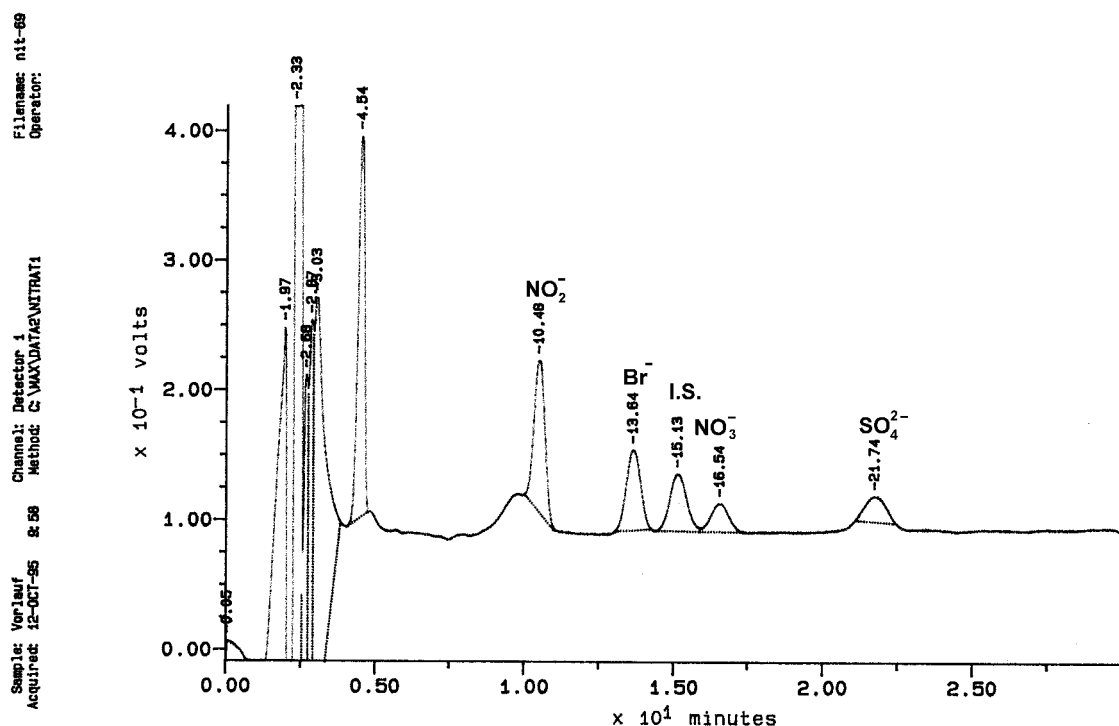
Die Durchführung der statistischen Analyse erfolgte mit SPSS (Statistical Package for the Social Science).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Interner Standard

Die Prüfung der Anionen zeigt folgende Ergebnisse: Unter den festgesetzten Bedingungen bei einer Retentionszeit von 16,81 min für Nitrat und einer Laufzeit von 30min ist keine chromatographische Darstellung bei den Anionen Bisulfit, Cyanid, Hexacyanoferrat, Molybdat, Chromat und Thiocyanat als interner Standard möglich.

Für die anderen Anionen ergeben sich frühe Retentionszeiten für Bromat 7,35min und Wolframat 5,82min. Arsenat hat Retentionszeiten von 16,44 min in der Chromatographie. Azid hat Retentionszeiten bei 15,65min. Chlorat weist Retentionszeiten von 15,40min und Thiosulfat wird bei 23,00min eluiert.



**Abbildung 4: Vorlauf mit Chlorat-Ion als interner Standard (I.S.) und andere Ionen wie Nitrit, Bromid, Nitrat und Sulfat**

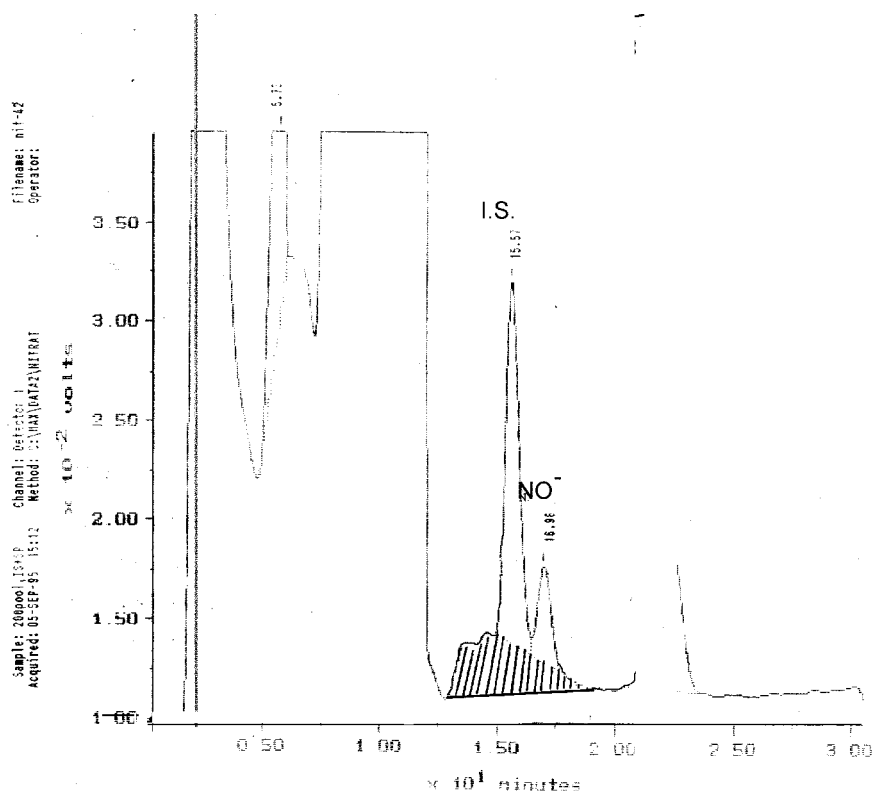
Da Chlorat die Anforderungen eines internen Standards (I.S.) in unserem System erfüllt, wird es im weiteren verwendet.

## 4.2 Ultrafiltration

Mit der Ultrafiltrationseinheit Ultrafree bei einer Ausschlußgrenze von 10.000 Dalton wurden in einer Winkelrotatorenzentrifuge bei 4.000, 7.000, 10.000 und 14.000Upm und bei einer Zentrifugationszeit von 30min aus den 300 µl Serum Ultrafiltrationsvolumina zwischen 83 und 210µl erreicht. Bei einer Zentrifugationszeit von 60min wurden bei den entsprechenden Upm 120 bis 240µl Serum ultrafiltriert.

Nach Waschung der Ultrafilter Centrisart mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 Dalton erhält man in einer Ausschwingrotatorenzentrifuge nach 15min, 20min, 30min, 45min, 60min folgende Ultrafiltrationsvolumina: 224µl, 253µl, 271µl, 272µl und 268µl.

Die 300µl Serumproben wurden im folgenden mit dem Ultrafilter Centrisart für 15min bei 4800Upm zentrifugiert, da mit diesem System ein optimales Ultrafiltrationsvolumen bei einer kurzen Zentrifugationszeit erzielt werden konnte.



**Abbildung 5: Chromatographie von Serum nach Ultrafiltration mit Ultrafilter Centrisart für 15min bei 4800Upm ohne Möglichkeit einer quantitativen Auswertung von Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)**

Wie das Chromatogramm des Ultrafiltrats in Abb. 5 zeigt, ist in unserem System nach der Proteinabscheidung keine quantitative Auswertung möglich, da störende Substanzen aus der Probenmatrix im Bereich von Nitrat und internem Standard koeluieren.

### **4.3 Flüssig-flüssig-Extraktion**

Es gelang nicht, die Störungen aus der Matrix mit organischen Extraktionsmitteln wie Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat, Diethylether zu eliminieren.

### **4.4 Fest-flüssig-Extraktion**

Die Aufarbeitung mit den Sep-Pak-Sorten Alumina A, N, B, NH<sub>2</sub>, Diol plus, Florisil und Silica ergaben keine quantitativ auswertbaren Chromatographien. Eine Entfernung der Störungen unterhalb der Substanzen, die von Interesse sind, gelang mit diesen Sep-Pak-Sorten nicht.

#### **Accell plus QMA**

Bei Accell plus QMA light, einem Anionenaustauscher, sollten Chlorat und Nitrat auf der Säule gebunden werden und anschließend durch Zugabe von Schwefelsäure und Phosphorsäure in den Konzentrationen 0,002M, 0,02M, 0,04M und 0,2M von der Anionenaustauschersäule verdrängt werden. Dies gelang jedoch nicht.

#### **Sep-Pak CN**

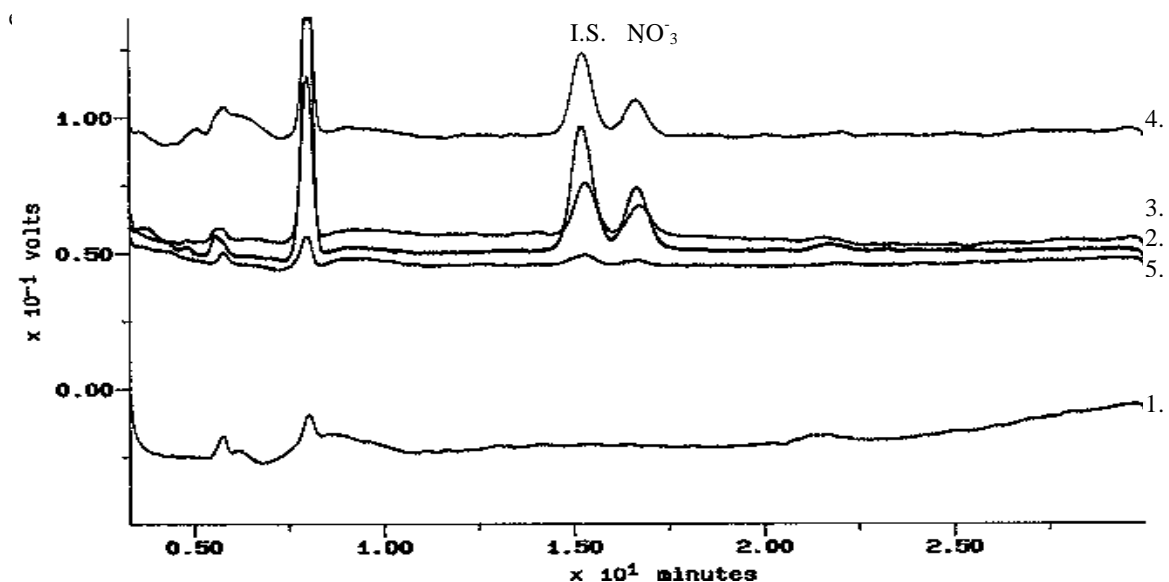
Die Sep-Pak-CN-Kartusche ist mit Nitrat kontaminiert, so daß mit diesem Sep-Pak eine Aufarbeitung nicht möglich ist.

#### **Sep-Pak C18 light**

Bei der Aufarbeitung mit Sep-Pak C18 light wurde ohne störende Matrixeffekte oder Verlust der eingesetzten Nitratmenge ein quantitativ auswertbare Chromatographie erzielt. Im folgenden wurde mit der Sep-Pak C18 light Kartusche gearbeitet.

## 4.5 Ermittlung des Fraktionsvolumens im Serum

Nach Ultrazentrifugation des Serums und Elution über den Sep-Pak C18 light wurde das Fraktionsvolumen, welche die optimalen Signale der beiden Analyten Nitrat und Chlorat in der Chromatographie wiedergibt, ermittelt. Dazu wurden einzelne Fraktionen des Eluates einer Serumprobe aufgefangen und chromatographiert, so daß die optimale Volumenfraktion ermittelt werden konnte. Aus der in Abb. 6 aufgeführten Chromatographie ist ersichtlich, daß die Aufnahme der ersten (1.) und letzten Fraktion (5.) in die Analyse nicht sinnvoll war, da eine unerwünschte Verdünnung der Probe erfolgt wäre.



**Abbildung 6:** Chromatographische Darstellung der einzelnen Volumenfraktionen des Eluates einer Serumprobe zur Ermittlung des benötigten Volumens für optimale Signale der beiden Analyten Nitrat und Chlorat (I.S.)



## 4.6 Optimierung der Chromatographiebedingungen

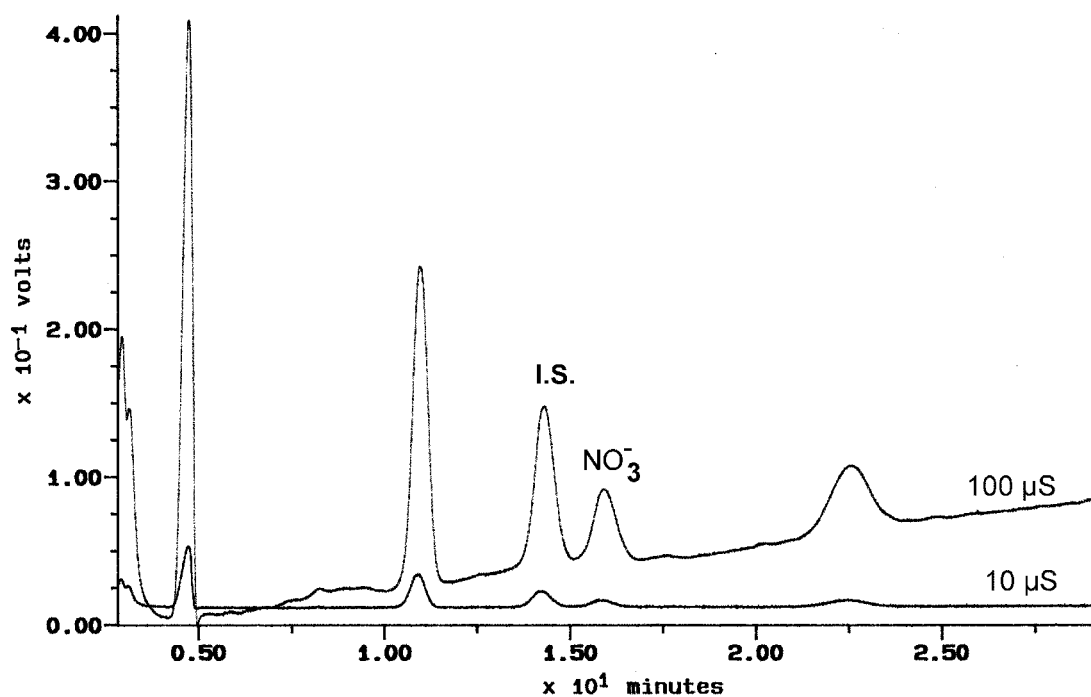
### 4.6.1 Flowprogramming

**Tabelle 3: Flowprogramming**

Flow [ml/min]	Chlorat Retentionszeit [min]	Nitrat Retentionszeit [min]	Chromatographie Laufzeit [min]
1,2	15,51	17,27	30
1,4	14,55	15,98	25
1,6	13,50	14,75	25
2,0	10,33	11,27	25

Die Durchflußgeschwindigkeit wird auf 2,0ml/min festgelegt, da die Retentionszeiten von Nitrat und dem internen Standard erheblich verkürzt werden können. Die zu erwartenden Retentionszeiten sind für Chlorat 10,33min und Nitrat 11,27min. Bei dieser Durchflußgeschwindigkeit werden Drücke von ca. 2.000psi erreicht.

#### 4.6.2 Signalo Optimierung



**Abbildung 7: Signalo Optimierung der Chromatographie durch selektive Verstärkung der Anionen**

Der Output des Leitfähigkeitsdetektors wird auf 100μS/1V festgesetzt.

In Abb. 7 erkennt man die Veränderung der Standardeinstellung am Leitfähigkeitsdetektor von 10μS/V auf 100μS/V. Sie führt zu einer selektiven Verstärkung der Anionen und somit des Analyten und dem internen Standard bei nahezu unverändertem Grundrauschen.

## 4.7 Übertragen der Methode auf weitere Medien

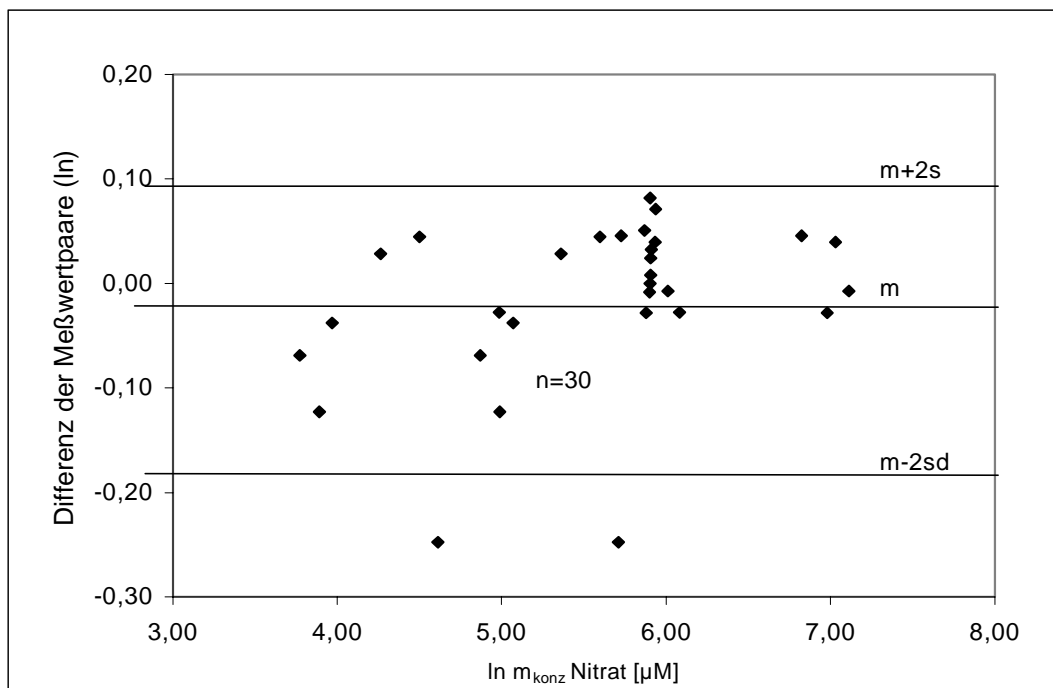
### 4.7.1 Methode für Nitratmessungen im Urin

Die Zentrifugationszeit ist 5min bei 14.000Upm. Chlorat wurde als interner Standard verwendet.

#### 4.7.1.1 Verdünnungsstufe

Die Nitratkonzentrationen bei einer Verdünnung von 1:2, 1:3, 1:5, 1:10 von Urin im Reinstwasser ergeben 190 $\mu$ M, 121 $\mu$ M, 73 $\mu$ M und 36 $\mu$ M, wobei ein linearer Verlauf erkennbar ist. Die Urinproben sind mit einer 1:3 Verdünnung verwendet worden, wenn nicht anders vermerkt.

#### 4.7.1.2 Messungen im Urin mit und ohne Sep-Pak



**Abbildung 8:** Vergleich der Nitratkonzentrationen im Urin mit und ohne Sep-Pak-Aufarbeitung. Die Differenz der Wertepaare liegen bis auf zwei im 95% Konfidenzintervall. Es besteht somit kein Unterschied zwischen den beiden Methoden.

In Abb. 8 ist jeweils die Differenz der logarithmierten ( $\ln$ ) Meßwertepaare der 30 Urinproben, die sich durch die Aufarbeitung mit Sep-Pak bzw. direkter wäßriger Injektion, d.h. ohne Sep-Pak, ergibt, gegen die mittlere logarithmierte Konzentration ( $\ln m_{\text{konz}}$ ) des Urinprobenpaares aufgetragen. Der Mittelwert der logarithmierten Differenz der beiden Methoden ist  $m = -0,017$ . Das 95% Vertrauensintervall liegt zwischen  $m + 2s = 0,144$  und  $m - 2s = -0,178$ . Bis auf zwei Aufarbeitungen liegen alle Meßwertpaardifferenzen in diesem Bereich. Aus den Ergebnissen, entschieden wir uns für die Methode der direkt wäßrigen Injektion bei Urinproben mit einem Injektionsvolumen von  $100\mu\text{l}$ . Die Prüfung auf einen Unterschied der beiden Aufarbeitungen anhand des Wilcoxon Tests für Paardifferenzen zeigte keine systematischen Abweichungen ( $p = 1,000$ ).

#### 4.7.2 Übertragung der Methode auf Zellmedium

Die Serum Methode wird direkt auf die Aufarbeitung von Zellmedium übertragen. Eine direkte Injektion wie bei den Urinproben ist wegen störender Substanzen im Bereich der Analyten nicht möglich. Im Zellmedium selbst ist kein Nitrat nachweisbar. Durch die Stickstoffdioxid (80%)-Äquilibration zur Leerwertermittlung wird kein Nitrat im System gebildet. Eine Nitratkontamination innerhalb des Systems konnte somit ausgeschlossen werden.

## 4.8 Quantifizierung

### 4.8.1 Eichung

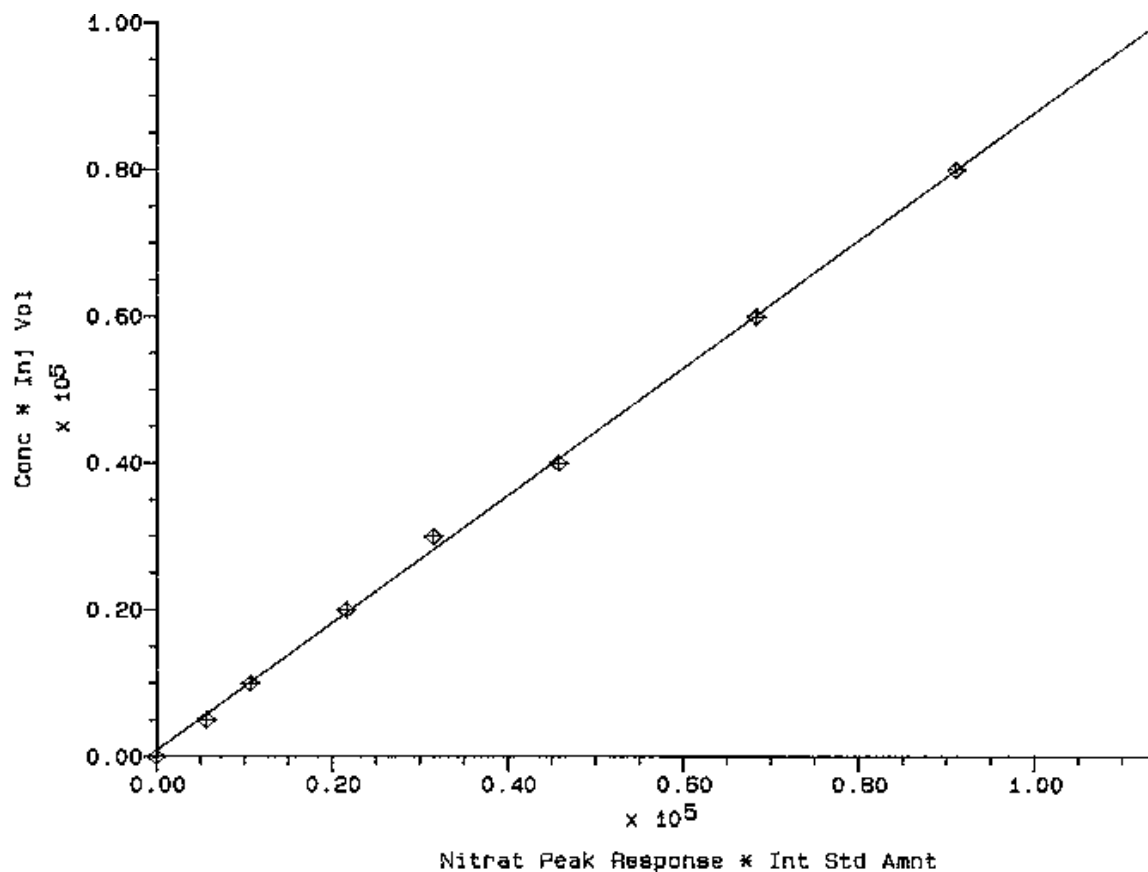


Abbildung 9: Eichkurve von Nitrat in Reinstwasser

$$r^2 = 0,999$$

$$c = 862,7 + 0,8685 \times R$$

R = response

Tabelle 4: Response der Eichwerte

Nitrat [µmol/l]	50	100	200	300	400	600	800
Response	0,12	0,23	0,46	0,67	0,98	1,46	1,94

Bei der Erstellung der rein wäßrigen Eichung mit den Nitratkonzentrationen zwischen 50µmol/l und 800µmol/l zeigt sich eine geringe Streuung der Meßwerte um die Regressionsgerade bei Auftragung der Nitrat Peak Response gegen die Konzentration. Das Bestimmtheitsmaß liegt bei  $r^2=0,999$  und damit nahezu bei dem Optimum von  $r^2=1$ .

Die rein wäßrige Eichung (a) wird mit der wäßrigen Sep-Pak Eichung (b) und mit einer Precinorm Serum Sep-Pak Eichung (c) verglichen. Die jeweiligen Aufarbeitungen (a, b, c) ergeben folgende Bestimmtheitsmaße:  $r^2(a)=0,999$ ,  $r^2(b)=0,999$ ,  $r^2(c)=0,998$ . Da die verschiedenen Aufarbeitungen keine wesentlichen Unterschiede in der Güte der Eichung ergeben, wird die rein wäßrige Eichung der Praktikabilität wegen bevorzugt.

#### 4.8.2 Kontrollserum

Geprüft wurden das Drug Free Serum Corning und das Precinorm Kontrollserum. Der interne Standard kann in beiden Seren verwendet werden. Das Chlorat interferiert nicht mit den anderen Substanzen in der biologischen Matrix.

Das Drug Free Serum wies einen Peak zu der Retentionszeit des Nitrats auf. Durch aufspiken des Drug Free Eluates wurde die Reinheit des Peaks deutlich, es handelt sich um einen Nitratpeak ( $c=240\mu\text{mol/l}$ ). Beim Precinorm Serum war weder eine Störung unter dem internen Standard noch ließ sich in der Chromatographie Nitrat nachweisen. Das auf 200µM Nitrat aufgespikte Precinorm Serum wurde als Kontrolle verwendet.

## 4.9 Qualitätssicherung

### 4.9.1 Stabilität

#### 4.9.1.1 Stabilität im Serum

**Tabelle 5: Stabilität von Nitrat im Serum bei 4°C über fünf Tage (d) und bei -40°C über fünf Wochen (w)**

d/w	Serum 53 µM Nitrat		Serum 308 µM Nitrat	
	bei 4°C	bei -40°C	bei 4°C	bei -40°C
1	53	53	291	310
2	45	57	295	309
3	52	56	293	311
4	59	60	287	302
5	59	52	310	307
m ± s	53,60 ± 5,81	55,60 ± 3,21	295,20 ± 8,78	307,80 ± 3,56
VK	10,84%	5,77%	2,97%	1,10%

Das 53µM Serum hat bei täglicher Einfachaufarbeitung über 5 Tage und Lagerung bei 4°C einen VK von 10,84% und bei wöchentlicher Einfachaufarbeitung über 5 Wochen einen VK von 5,77%. Das 308µM Serum hat bei 4°C einen VK von 2,97% und bei -40°C einen VK von 1,10%.

#### 4.9.1.2 Stabilität im Urin

**Tabelle 6: Stabilität von Nitrat im Urin bei 4°C über fünf Tage (d) und bei -40°C über fünf Wochen (w)**

d/w	Urin 127 µM Nitrat		Urin 329 µM Nitrat	
	Nitrat [µM] bei 4°C	Nitrat [µM] bei -40°C	Nitrat [µM] bei 4°C	Nitrat [µM] bei -40°C
1	127	128	329	345
2	129	144	332	343
3	138	132	332	354
4	151	135	335	330
5	158	115	358	336
m ± s	140,60 ± 13,58	133,00 ± 7,07	337,20 ± 11,82	341,60 ± 9,13
VK	9,65%	5,32%	3,50%	2,67%

Die Stabilitätsmessungen im 127µM Nitrat Urin über 5 Tage bei 4°C ergeben einen VK von 9,65%. Bei -40°C ergibt sich ein VK von 5,32% bei wöchentlicher Einfachaufarbeitung über 5 Wochen. 329µM Urin ergibt bei 4°C einen VK von 3,50% und bei -40° C einen VK von 2,67%. Die Urinproben wurden, wenn nicht sofort aufgearbeitet, stets bei -40°C eingefroren.



## 4.9.2 Präzision und Richtigkeit

### 4.9.2.1 Inter-assay-Präzision im Serum

**Tabelle 7: Inter-assay-Präzision im Serum**

Tag	Serum Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]
1	221
2	223
3	215
4	209
5	204
6	194
7	186
8	192
9	216
10	209
$m \pm s$	$206,9 \pm 12,69$
VK	6,13%

Der Variationskoeffizient beträgt 6,13% für die Präzision von Tag zu Tag für Nitrat im Serum.

#### 4.9.2.2 Intra-assay-Präzision und Richtigkeit im Serum

**Tabelle 8: Intra-assay-Präzision im Serum und Richtigkeit**

Lauf	Soll 100 µM Nitrat Serum	Soll 300 µM Nitrat Serum
1	111	314
2	96	310
3	106	295
4	91	292
5	106	311
6	112	316
7	108	320
8	109	300
9	109	314
10	---	308
m ± s	105,33 ± 7,11	308,00 ± 9,32
VK	6,74%	2,87%

Der Variationskoeffizient beträgt 6,74% für die Präzision bei 105,33 µM Nitrat und 2,87% bei 308,00µM Nitrat in der Serie im Serum. Es wird die Richtigkeit der Methode für Nitrat im Serum bestimmt. Der relative Fehler beträgt 5,33% für 100µM Serum und 8,00% für 300µM Serum jeweils als Sollkonzentration und die Richtigkeit somit 105,33% und 108,00%.

#### 4.9.2.3 Präzision im Urin

**Tabelle 9: Intra-assay-Präzision im Urin**

Lauf	Urin Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]
1	345
2	366
3	351
4	363
5	366
6	363
7	366
8	366
m $\pm$ s	360,75 $\pm$ 8,14
VK	2,25%

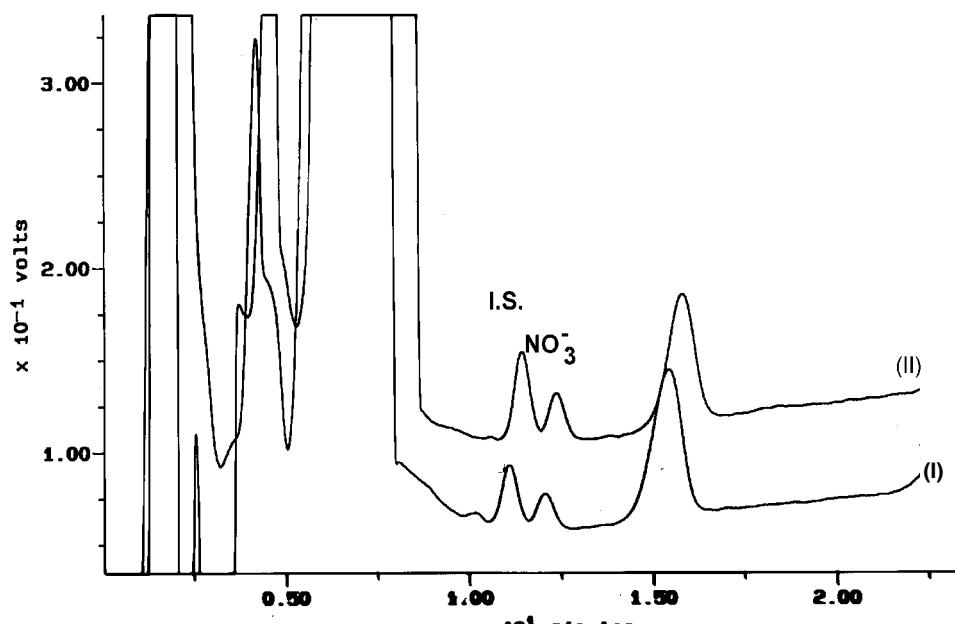
Bei den in Serie chromatographierten Urinproben ist die Präzision der Messungen 2,25%.

#### 4.9.3 Empfindlichkeit

Die untere Empfindlichkeitsgrenze für Nitrat wird bei 10 $\mu\text{mol/l}$  im Serum festgelegt. In wäßrigen Medium (Reinstwasser) liegt die untere Empfindlichkeit bei 5 $\mu\text{mol/l}$ .

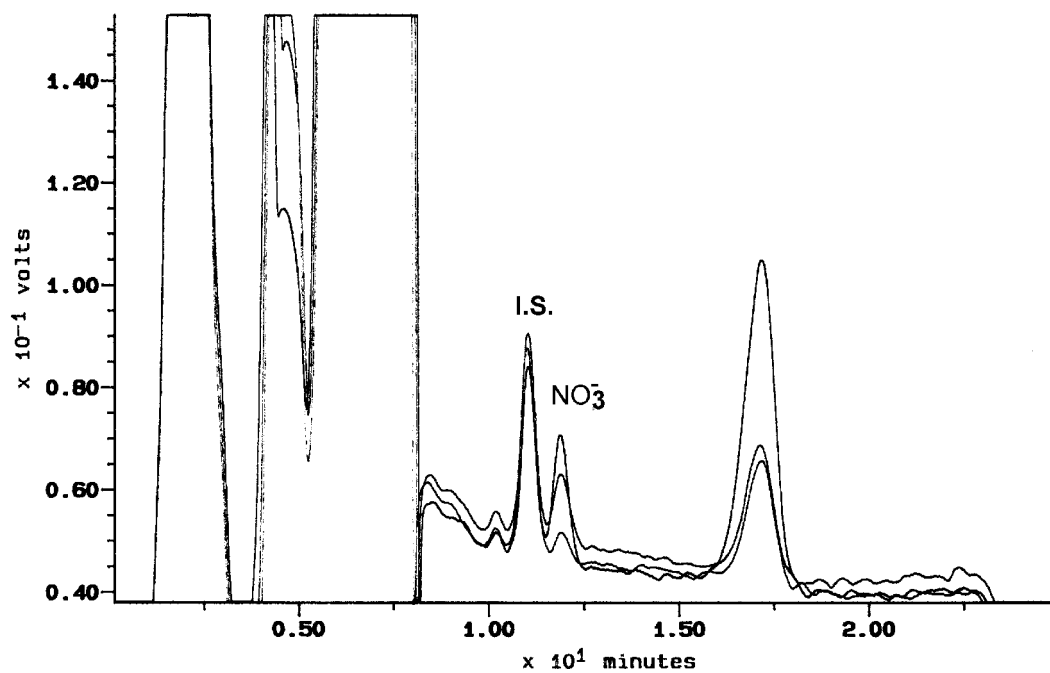
## 4.10 Anwendung der HPLC-Methode

### 4.10.1 Nitrat und Met-Hb im Serum und Urin bei Patienten mit iNO-Therapie (in vivo)



**Abbildung 10:** Serum von iNO-Patient K., R. 24h nach Beginn der iNO-Therapie (I) mit einer gemessenen 248µmol/l Nitratkonzentration (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und einem Kontrollserum mit 200µmol/l Nitrat (II)

In Abb. 10 ist das Chromatogramm eines iNO Patienten K., R. nach Beginn der 24h-iNO Gabe (24h w NO) mit einer Nitratkonzentration von 248µmol/l im Serum (I) und einem Precinorm Kontrollserum mit 200µmol/l Nitrat im Overlay dargestellt.



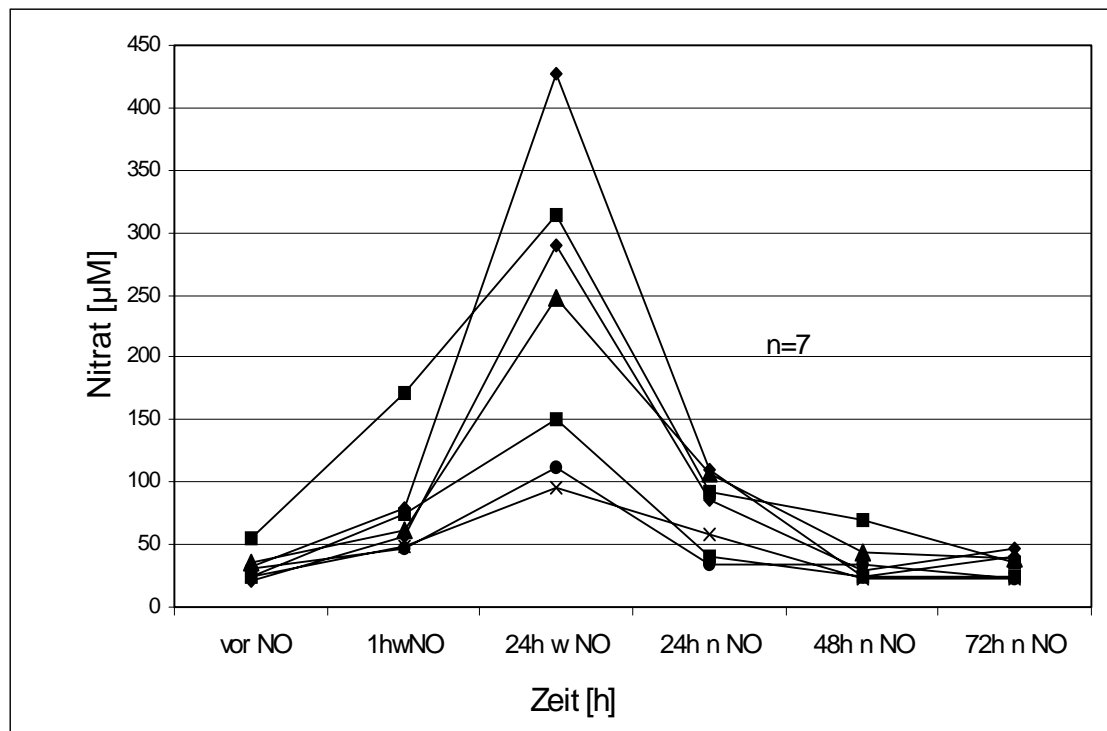
**Abbildung 11: Urin von iNO-Patient K., P. Chromatographische Darstellung von drei verschiedenen Nitratkonzentrationen im Urin zu den Zeitpunkten 1h während iNO, 24h während iNO, 48h nach iNO im Overlay**

In Abb. 11 sind die Nitratkonzentrationen im Urin bei einem Patienten während der iNO-Therapie im Overlay dargestellt. Die Nitratkonzentrationen betragen während 1h NO 570 $\mu$ mol/l (1:3 Verdünnung, 1h w NO), während 24h NO 1410 $\mu$ mol/l (1:10 Verdünnung, 24h w NO) und nach 48h NO 186 $\mu$ mol/l (1:3 Verdünnung, 48h n NO).

Es folgt eine Meßwertabelle der Nitratkonzentrationen ( $m \pm s$ ) und Met-Hb Werte ( $m \pm s$ ) im Serum ( $n=7$ ) und Urin ( $n=5$ ) bei den iNO-Patienten zu den Zeitpunkten vor NO, 1h während (w), 24h w NO sowie 24h nach (n), 48h n und 72h n NO. Die Werte sind als Mittelwerte (m) mit Standardabweichung (s) dargestellt.

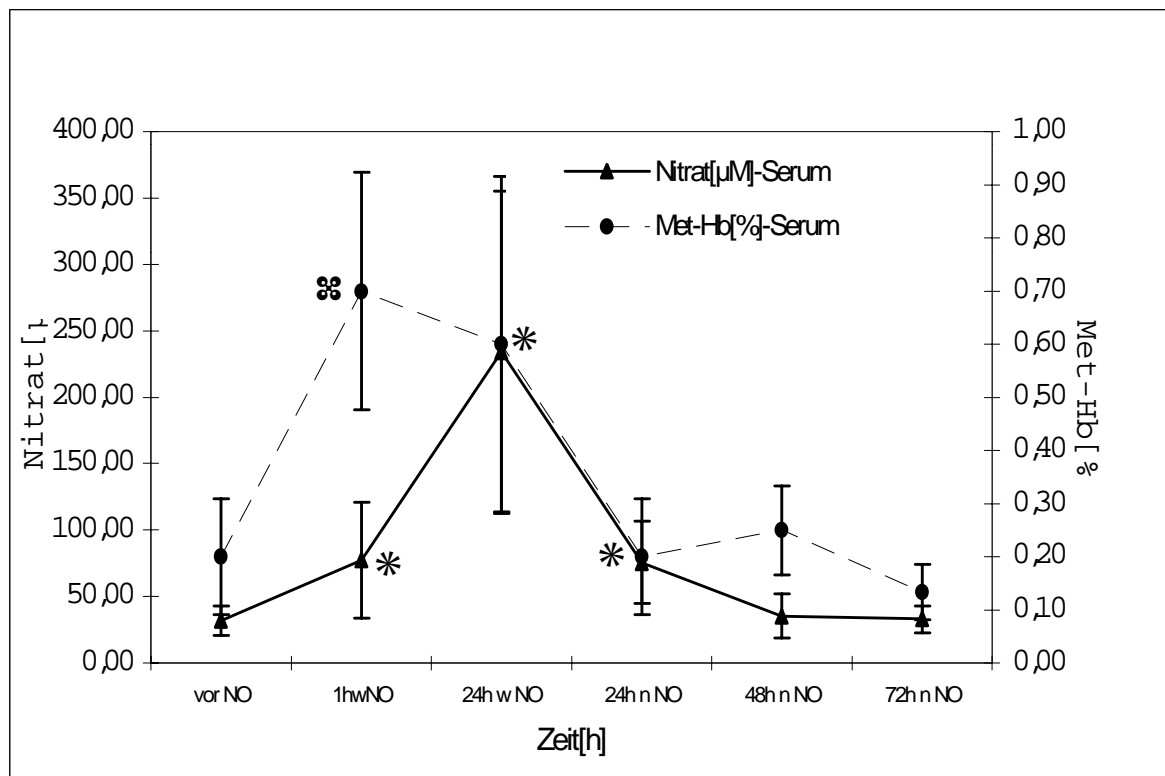
**Tabelle 10: Nitratkonzentrationen und Met-Hb-Werte im Serum und Urin bei iNO-Patienten ( $m \pm s$ ) zu den Zeitpunkten vor NO, 1h während (w), 24h w NO sowie 24h nach (n), 48h n und 72h n NO.**

Zeitpunkt Nitrat Messung (t=h)	Nitrat [ $\mu$ M]im Serum $m \pm s$ , n=7	Met-Hb [%] im Serum $m \pm s$ , n=7	Nitrat[ $\mu$ M] im Urin $m \pm s$ , n=5
vor NO	$31,86 \pm 11,35$	$0,20 \pm 0,11$	$346,20 \pm 223,65$
1h w NO	$77,29 \pm 43,60$	$0,70 \pm 0,22$	$444,00 \pm 287,28$
24h w NO	$234,00 \pm 121,35$	$0,60 \pm 0,32$	$1225,40 \pm 293,86$
24h n NO	$75,57 \pm 30,99$	$0,20 \pm 0,11$	$655,80 \pm 251,02$
48h n NO	$35,29 \pm 16,44$	$0,25 \pm 0,08$	$436,40 \pm 234,03$
72h n NO	$33,00 \pm 10,23$	$0,13 \pm 0,05$	$339,20 \pm 221,68$



**Abbildung 12:** Nitratkonzentrationen im Serum bei den sieben iNO-Patienten zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten. Die Meßzeitpunkte sind: vor NO, 1h während NO, 24h während NO, 24h, 48h und 72h nach NO-Gabe. (Jedes Symbol entspricht jeweils dem Serum eines Patienten)

Die Nitratkonzentrationen im Serum werden zu den Abnahmezeitpunkten: vor NO, 1h nach Beginn der NO-Therapie, 24h während NO, 24h, 48h und 72h nach NO bei iNO-Patienten einzeln im Verlauf dargestellt. Nach der Applikation von NO steigt das Nitrat im Serum bei allen Patienten an. Nach Absetzen der NO-Inhalation werden wieder innerhalb von 48h annähernd die Ausgangswerte erreicht. Die Anstiege der Nitratkonzentrationen im Serum sind während iNO gleichsinnig, die NO Konzentrationen zwischen 15 und 30ppm variierend bei einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,421$ .



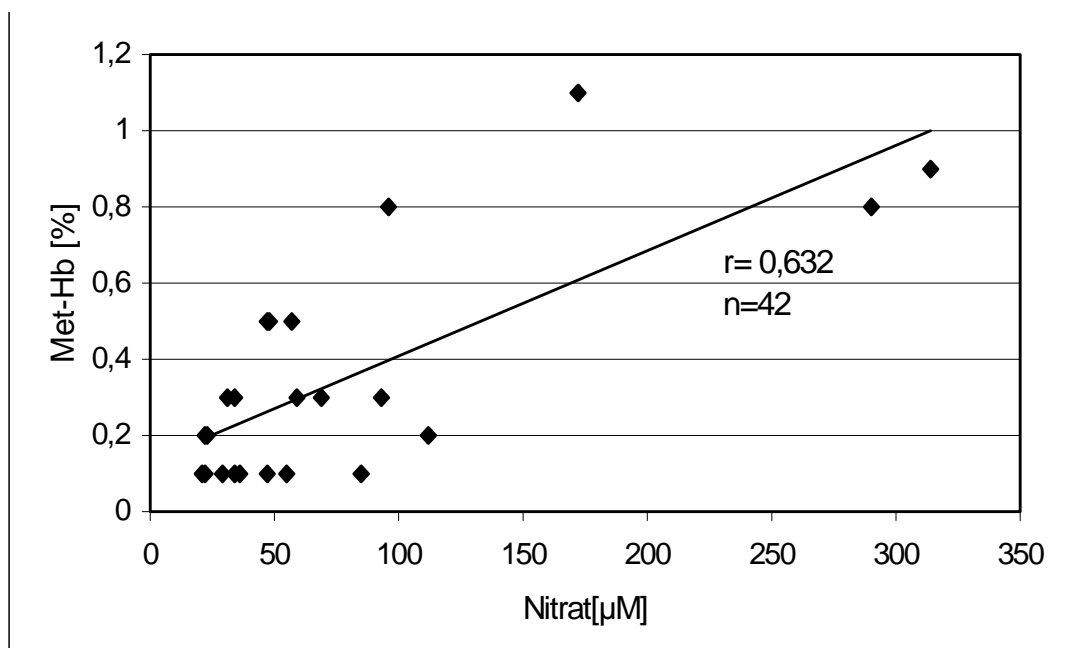
**Abbildung 13:** Nitrat und Met-Hb im Serum bei iNO-Patienten (m ± s). Es werden die Mittelwerte (▼,●) und Standardabweichungen (⊥) der gemessenen Nitratkonzentration im Serum sowie der Met-Hb Werte der iNO-Patienten zu den jeweiligen Meßzeitpunkten gezeigt. Die Meßzeitpunkte sind: vor NO, 1h während NO, 24h während NO, 24h, 48h und 72h nach NO-Gabe. Signifikante p-Werte sind mit \*, \*\* gekennzeichnet.

Die Nitratkonzentration im Serum ist vor der iNO Therapie  $31,86 \mu\text{M} \pm 11,35$ . Bereits nach Beginn von einer Stunde iNO steigt das Nitrat im Serum auf  $77,29 \mu\text{M} \pm 43,60$  ( $p=0,016$ , \*). Das Maximum bei den von uns erhobenen Zeitpunkten ist bei 24 h während NO mit  $234,00 \mu\text{M} \pm 121,35$  erreicht ( $p=0,016$ , \*). 24 h nach Beendigung von iNO, ist ein Abfall auf  $75,57 \mu\text{M} \pm 30,99$  zu verzeichnen ( $p=0,016$ , \*). Die Nitrat Veränderungen können als hochsignifikant bezeichnet werden. Nach 48h sind die Werte bei  $35,29 \mu\text{M} \pm 16,44$  ( $p=0,313$ ) sowie nach 72h (72h n NO) bei  $33,00 \mu\text{M} \pm 10,23$  ( $p=0,984$ ), wobei diese p-



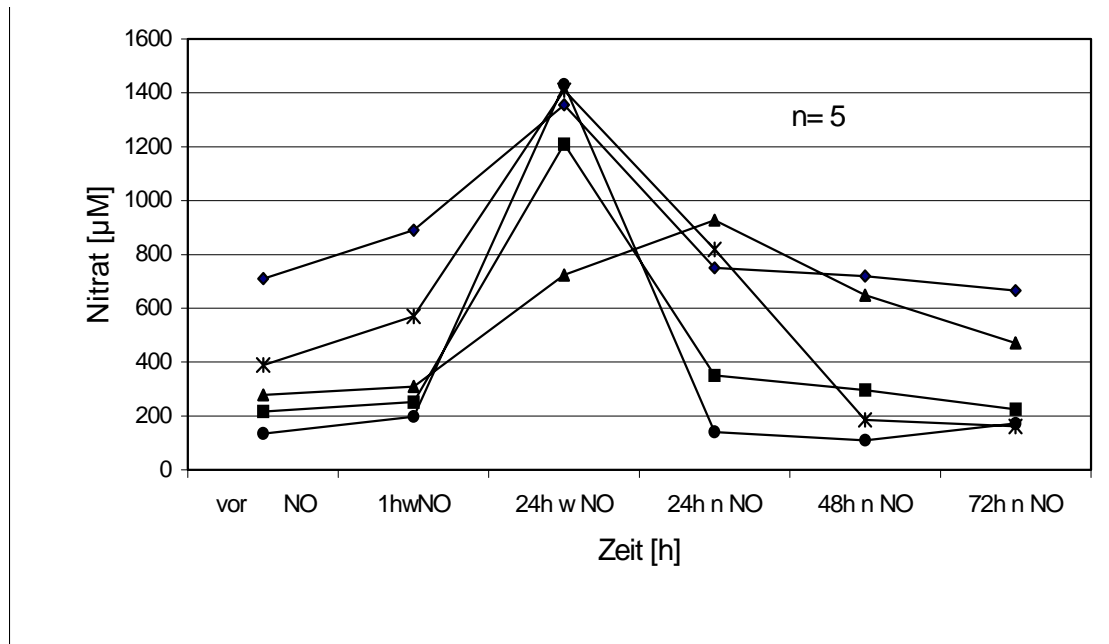
Werte jeweils deutlich über dem 5%-Niveau liegen und somit kein Unterschied zum Ausgangswert besteht.

Das Met-Hb [%] hat nach einer Stunde iNO sein Maximum mit  $0,20 \pm 0,11$  erreicht ( $p=0,016$ , **\*\***). Während 24 Stunden iNO sinkt es gering ab mit  $0,60 \pm 0,32$  und fällt nach Beendigung der iNO auf den Ausgangswert  $0,20 \pm 0,11$  zurück. Eine signifikante Steigerung von Met-Hb während iNO ist außer bei der Met-Hb Messung nach einer Stunde iNO nicht zu verzeichnen (24h w NO  $p=0,078$ , 24h n NO  $p=1,000$ , 48h n NO  $p=1,000$ , 72h n NO  $p=0,125$ ).



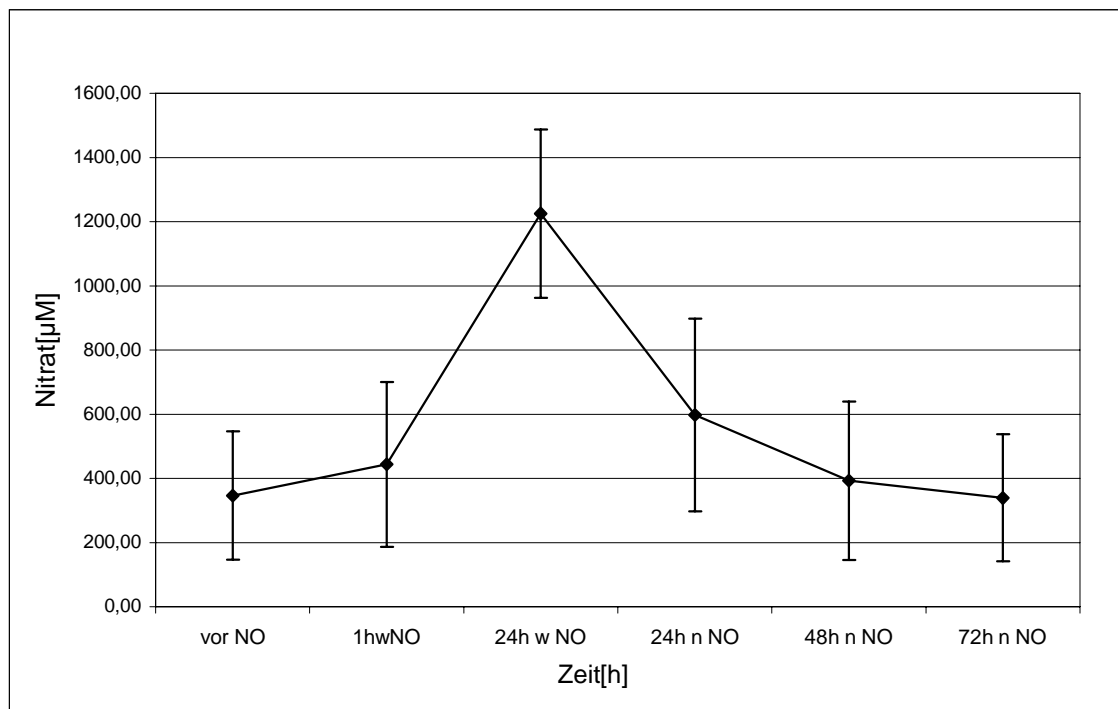
**Abbildung 14: Met-Hb Bildung und Nitratkonzentrationen bei den iNO-Patienten.**  
**Bei den iNO-Patienten werden die ermittelten Met-Hb Werte gegen die Nitratkonzentrationen (♦) im Serum gegeneinander aufgetragen.**

Zwischen den Met-Hb Werten und den Nitratkonzentrationen im Serum ist ein Zusammenhang erkennbar. Es ergibt sich die Regressionsgerade  $y=0,0028 x + 0,1321$  mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,632$ .



**Abbildung 15: Nitratkonzentration im Urin bei fünf iNO-Patienten zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten**  
(Jedes Symbol entspricht jeweils dem Urin eines Patienten)

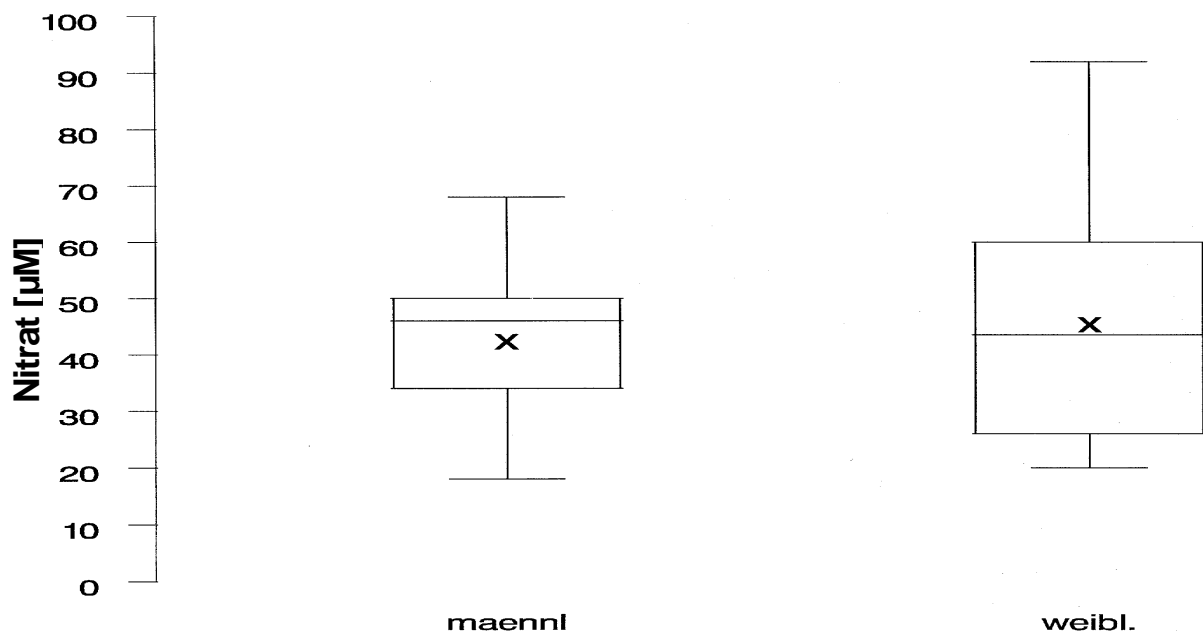
In Abb. 15 ist die Nitratkonzentration im Urin von jedem einzelnen iNO-Patienten im Verlauf dargestellt. Die Abnahmezeitpunkte sind: vor NO, 1h nach Beginn der NO-Therapie, 24h während NO, 24h, 48h und 72h nach iNO. Die Anstiege der Nitratkonzentrationen im Urin sind während iNO gleichsinnig, die NO Konzentrationen bewegen sich zwischen 15 und 30ppm bei einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,538$ .



**Abbildung 16: Nitratkonzentrationen im Urin bei iNO-Patienten ( $m \pm s$ ). Die Nitratkonzentration im Urin der iNO-Patienten sind als Mittelwerte (♦) und Standardabweichungen (⊥) zusammengefaßt. Die Meßzeitpunkte sind: vor NO, 1h nach Beginn der NO-Therapie, 24h während iNO, 24h, 48h und 72h nach NO-Gabe.**

Die Nitratkonzentration im Urin vor iNO beträgt  $346,20\mu\text{M} \pm 22,65$ . Nach einer Stunde steigt das Nitrat auf  $444,00\mu\text{M} \pm 287,28$  an ( $p= 0,063$ ). Das Maximum ist bei 24h während iNO bei  $1225,40\mu\text{M} \pm 293,86$  erreicht ( $p= 0,063$ ). Nach Absetzen der iNO-Therapie ist nach 24h noch eine Konzentration von  $655,80\mu\text{M} \pm 251,02$  ( $p= 0,063$ ), nach 48h nur noch  $436,40 \pm 234,03\mu\text{M}$  ( $p= 0,813$ ) nach 72h sind nur noch eine  $339,20\mu\text{M} \pm 221,68$  meßbar ( $p= 1,000$ ). Bei Anwendung des Wilcoxon-Test für Paardifferenzen sind die p-Werte nicht als signifikant anzusehen, sind jedoch während und auch noch 24 h nach der NO-Gabe als knapp signifikant zu bezeichnen.

#### 4.10.2 Normalwerte - Nitratkonzentrationen im Serum und Urin bei Patienten ohne iNO-Therapie



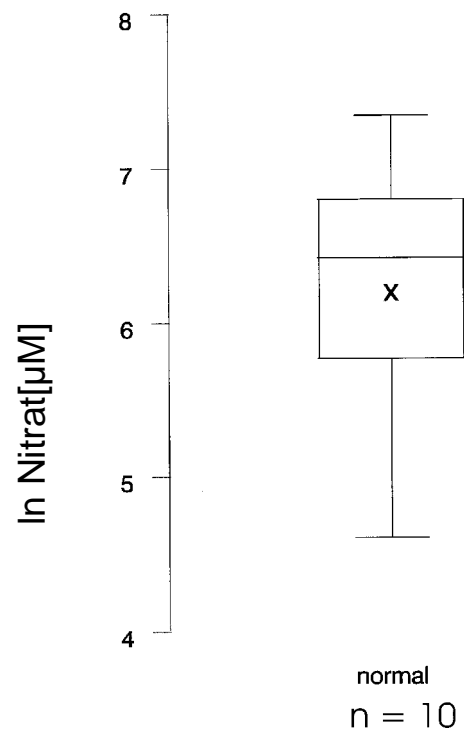
**Abbildung 17: Nitrat im Serum bei 27 ambulanten jungen Patienten (w=10, m=17)**  
**Mit Darstellung von Minimum, 1. Quartil, Median, Mittelwert und**  
**Maximum in Form von Box Plots.**

**Tabelle 11: Nitratkonzentrationen im Serum bei 27 ambulanten Patienten, 17**  
**männlich und 10 weiblich**

	Nitrat [µM] n = 27 gesamt	Nitrat [µM] n = 17 männlich	Nitrat [µM] n = 10 weiblich
m ± s	43,41 ±16,97	42,29 ± 13,22	45,30 ± 22,69
Min	18,00	18,00	20,00
1.Quartil	30,50	34,00	27,00
Median	45,00	46,00	45,00
3.Quartil	53,00	50,00	58,50
Max	92,00	68,00	92,00

Die Abb. 17 und Tab. 11 zeigen die Verteilung der Nitratkonzentration im Serum bei Kindern und nach Geschlecht getrennt. Bei der gesamt erhobenen Stichprobe ist die Nitratkon-

zentration  $43,41\mu\text{M} \pm 16,97$  mit einem Minimum von  $18,00\mu\text{M}$ , dem 1.Quartil von  $30,50\mu\text{M}$ , einem Median von  $45,00\mu\text{M}$ , einem 3.Quartil von  $53,00\mu\text{M}$  und einem Maximum von  $92\mu\text{M}$ . Die Aufteilung der Stichprobe nach Geschlecht liefert ähnliche Werte, wie man in der Tab. 11 sehen kann. Boxplot, Tabelle und der multivariate F-Test (Covarianzanalyse) zeigen, daß die Nitratkonzentration im Serum bei unserer Stichprobe von 27 Kindern weder vom Alter ( $p=0,42$ ) noch vom Geschlecht ( $p=0,95$ ) abhängig ist.



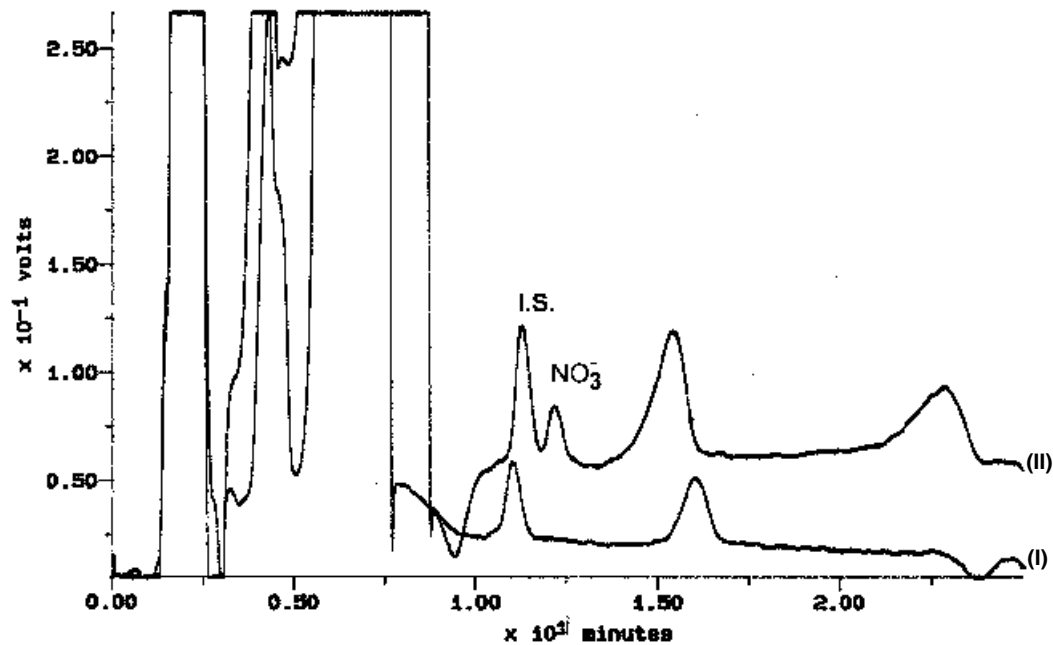
**Abbildung 18: Bei Patienten ohne iNO Therapie ermittelte Urin-Normalkonzentrationen von Nitrat**

**Tabelle 12: Verteilung der Nitratkonzentration im Urin bei 10 Patienten ohne iNO Therapie – ermittelte Verteilung der Urin Normalkonzentrationen von Nitrat. Es sind Absolutwerte und logarithmierte (ln) im Urin bei Kindern (n=10) ohne iNO-Therapie angegeben.**

	Normal Urin Nitrat [ $\mu\text{M}$ ] n=10	Normal Urin ln Nitrat [ $\mu\text{M}$ ] n=10
m $\pm$ s	628,20 $\pm$ 428,06	6,19 $\pm$ 0,81
Min	100,00	4,61
1.Quartil	323,75	5,78
Median	615,50	6,42
3.Quartil	852,50	6,74
Max	1551	7,35

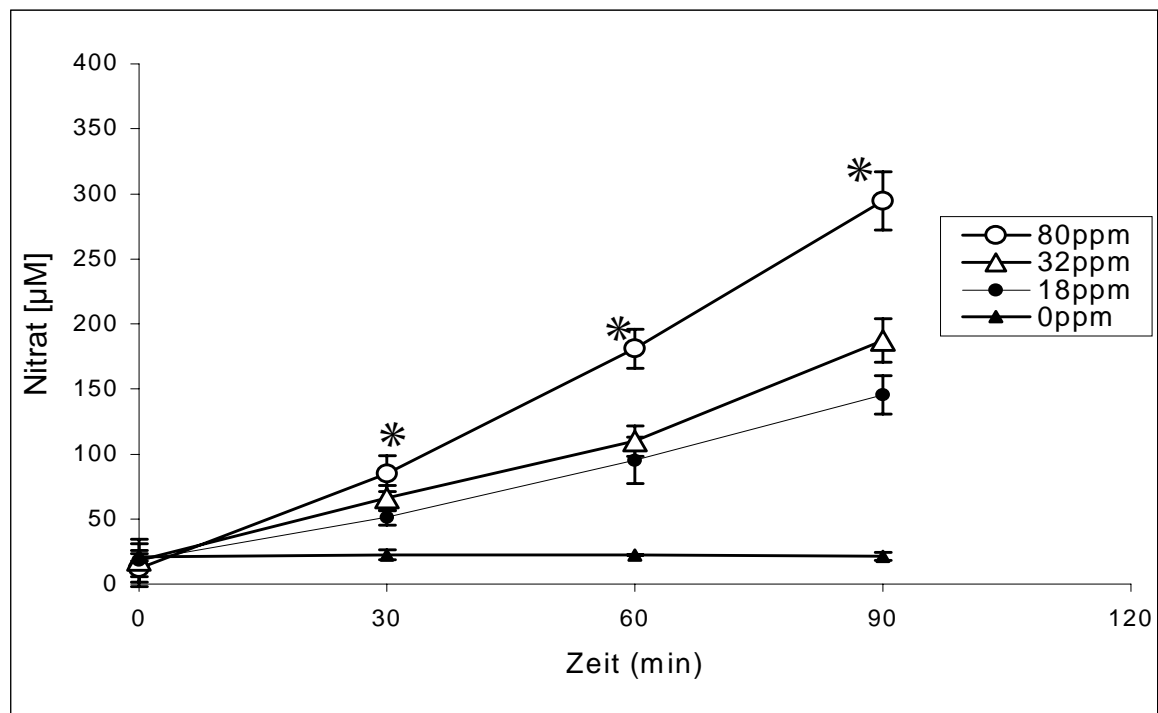
Tabelle 12 zeigt die Verteilung der Nitratkonzentrationen bei Kindern (n=10) ohne pathologisch erhöhte Leukozytenwerte im Urin. Die Nitratkonzentrationen sind sowohl als Absolutwerte im Urin als auch als natürlicher Logarithmus (ln) dargestellt. Die Nitratkonzentrationen im Normalurin bei Kindern (n=10) haben einen Mittelwert von 628,20 $\mu\text{M}$   $\pm$  428,06, ein Minimum von 100 $\mu\text{M}$ , ein 1. Quartil von 323,75 $\mu\text{M}$ , ein Median von 615,50 $\mu\text{M}$ , ein 3.Quartil von 852,50 $\mu\text{M}$  und ein Maximum von 1551 $\mu\text{M}$ .

### 4.10.3 Nitratkonzentrationen im Zellmedium durch in vitro NO-Äquibrierung



**Abbildung 19:** Chromatographische Darstellung der Nitratkonzentration im Zellmedium bei in vitro Äquibrierung mit 80ppm NO vor der NO-Äquibrierung(I), wobei kein Nitrat nachweisbar ist und nach 60 Minuten während der NO-Äquibrierung (II) mit einer gemessenen Nitratkonzentration von 162µmol/l

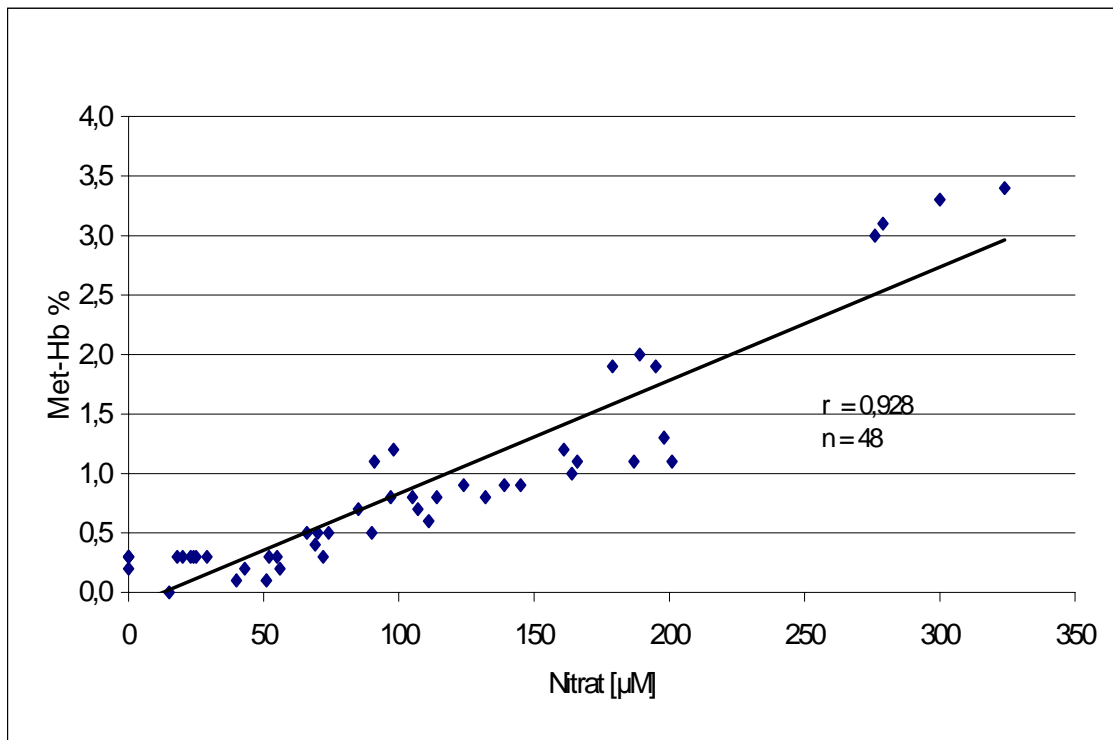
Abbildung 19 zeigt die chromatographische Darstellung der Nitratbildung im Zellmedium. In dem Chromatogramm I ist vor der NO-Äquibrierung keine Nitratkonzentration meßbar. Nach 60 Minuten NO-Äquibrierung mit 80ppm NO sind im Zellmedium 162µmol/l Nitrat nachweisbar (Chromatogramm II).



**Abbildung 20:** Dosis-Wirkungsbeziehung der unterschiedlichen NO-Konzentrationen und Nitratbildung bei der in vitro Äquilibration der Erythrozyten im Zellmedium. Jedes Symbol entspricht der gebildeten Nitratkonzentration durch Erythrozyten im Zellmedium bei der jeweiligen NO-Äquilibration und ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt ( $\perp$ ). Die Nitratkonzentrationsänderung gegenüber dem Ausgangswert sind bei 18ppm, 32ppm und 80ppm zu den Zeitpunkten 30min, 60min und 90min jeweils signifikant \*.

In Abhängigkeit von der Zeit (0min, 30min, 60min, 90min) sind die Nitratkonzentrationen ( $m \pm s$ ) bei der in vitro Äquilibration von 0ppm, 18ppm, 32ppm, 80ppm von NO dargestellt. Ein Anstieg ist bei Äquilibration von 0ppm nicht zu erwarten ( $p > 0,05$ ), zeigt jedoch daß keine Nitratbildung außerhalb der NO-Äquilibration stattfindet. Deutlich erkennbar sind die jeweils signifikanten bzw. hochsignifikanten Anstiege der Nitratkonzentration sowohl in Abhängigkeit der Zeit als auch in Abhängigkeit der Äquilibrationkonzentration von NO ( $p < 0,05$  bzw. stets  $p < 0,01$ , bis auf einen p-Wert bei 18ppm NO-Äquilibration nach 30min  $p = 0,023$ )





**Abbildung 21: Nitrat und Met-Hb der Erythrozyten im Zellmedium bei in vitro NO-Äquilibration. Alle erhobenen Nitratkonzentrationen und zugehörigen Met-Hb Werte sind als Punktwolke dargestellt**

Die jeweiligen Wertepaare (◆), Nitratkonzentration und Met-Hb im Zellmedium während der in vitro NO-Äquilibration, sind in Abbildung 25 als Punktwolke dargestellt. Es ergibt sich folgende Regressionsgerade  $y=0,0082 \times \text{Nitrat}-0,0184$  und ein Korrelationskoeffizient  $r=0,928$ .

Aus der Graphik als auch anhand der erhobenen Korrelationskoeffizienten ist ersichtlich, daß beide Indikatoren des NO-Stoffwechsels sich in vitro gleichsinnig verhalten. Mit steigendem Met-Hb, steigt auch die Konzentration des Nitrates im Zellmedium an.

## 5 Diskussion

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für die quantitative Messung von Nitrat. Eine sehr gängige Methode zur Nitrit -bzw. Nitratmessung ist die spektrophotometrische Bestimmung, die auf der Griess-Reaktion beruht. Das Griess-Reagenz (Naphthyl-Ethylendiamin Dihydrochlorid, Salpetersäure) reagiert nicht mit Nitrat, dem Hauptstoffwechselendprodukt von NO, sondern mit Nitrit. Deshalb wird häufig im ersten Schritt Nitrat zu Nitrit über Cadmiumsäulen reduziert, oder es erfolgt eine enzymatische Reduktion mittels der Aspergillusreductase. Dann erst kann die Probe mit dem Griess-Reagenz versetzt und der entstehende rote Azofarbstoff bei einer Wellenlänge von 546nm gemessen werden. Möchte man die Nitritkonzentration ebenfalls messen, wird die spektrophotometrische Messung auch vor der Nitratreduktion durchgeführt (Viinkka, 1996). Eine alleinige Nitratmessung ist mit der Aspergillusreductase und spektrophotometrischer Messung des entstehenden NADPH auch bei 340nm möglich (Gilliam et al., 1993). Weitere Methoden zur Messung von Nitrat sind die Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit guter Sensitivität und Empfindlichkeit (Tsikas et al., 1994). Jedoch hat sich dieses Verfahren aufgrund hoher Kosten nicht in den klinischen Routinelaboren etabliert (Viinkka, 1996).

Die Ionenchromatographie findet breite Anwendung bei Nitratmessungen in biologischen Matrices. Die Ionenpaarchromatographie auf der Basis einer Reversed Phase Chromatographie unter Zugabe von Ammoniumsalz als Gegenion und mobiler Phase auf Wasser-Acetonitrilgemisch mit UV-Detektion bei 208nm ist beschrieben (Leone und Kelm, 1996). Es gibt aber auch die Möglichkeit der Ionenaustauschchromatographie und UV-Detektion bei 214nm. Häufig werden hierbei auf Polymerharz basierende Trennsäulen eingesetzt. Mit dieser Polymerharzsäule, einem Eluens als Natriumcarbonat-Natriumhydrogen-carbonatgemisch, einer nachgeschalteten Suppressorsäule, einer Doppeldetektion mit UV- und Leitfähigkeitsdetektor ist eine Methode zur Messung von verschiedenen Anionen, u.a. von Nitrat ebenfalls möglich (Böhn et al., 1993). Zur Nitratmessung von Plasma können sowohl UV-Detektoren als auch Leitfähigkeitsdetektoren befriedigend eingesetzt werden (Everett et al., 1995). Es werden jedoch derzeit im geringeren Maß Leitfähigkeitsdetektoren als UV-Detektoren bei Einsatz von Polymerharzsäulen verwendet (Stratford, 1999).

Bisher ist wenig bekannt über die Kombination einer Anionenaustauschersäule und einem Leitfähigkeitsdetektor zur Messung von Nitrat in biologischen Matrices. Hierbei ist eine Suppressorsäule nicht notwendig. Wir etablierten eine Methode zur Nitratmessung mittels

HPLC mit einem Eluens aus Acetonitril/Borat-Konzentrat. Eine Anionenaustauschersäule mit synthetisch vernetztem Polymethacrylat-Harz, 150mm x 4,6mm, 10µm Partikelgröße und einer Kapazität von ca. 30µeq/ml, wurde von uns erfolgreich eingesetzt. Somit ist eine weitere präzise Methode mit einer Laufzeit von 25min zu den oben beschriebenen hinzugekommen. Das HPLC-System ist apparativ nicht sehr aufwendig und vor allem weniger anfällig für Störungen als die Griess-Methode und es wird direkt das eigentliche Stoffwechselendprodukt Nitrat ausgewertet. Biogene Amine können die Griess-Reaktion ebenfalls stören. Eine Nitritmessung in unserem System wird möglich, wenn der Chloridpeak durch Silberfällung vor der Proteinfällung durchgeführt wird. Hierfür gibt es kommerziell erhältliche On-guard-Kartuschen. Welche Methode im speziellen angewandt wird, hängt wahrscheinlich auch von den vorhandenen Gerätschaften, eigenen Erfahrungen und dem Ziel der Nitratmessung ab. Außerdem ist bekannt, daß die Säulen auf Basis von organischen Polymerharzen eine bessere Reproduzierbarkeit aufweisen als mit Silica-Gel beschichtete Säulen. Die eingesetzte Säule ist zwar teurer, aber es hat sich herausgestellt, daß sie bei effizientem Einsatz von Vorsäulen langlebiger ist (Stratford, 1999).

Die Etablierung der Methode soll im einzelnen diskutiert werden.

## 5.1 Interner Standard

Verschiedene Anionen wurden auf ihre Eignung als interner Standard untersucht. Nicht alle Anionen lagen im Zeitfenster oder konnten mit der von uns eingesetzten Konzentration in unserem System chromatographiert werden. Die Anionen Bromat, Wolframat und Thio-sulfat haben zu kurze oder zu lange Retentionszeiten innerhalb der festgesetzten Chromatographiezeit von 25min. Sie würden in einer Serumchromatographie durch Chlorid bei kurzer Retentionszeit oder Sulfat bei langer Retentionszeit gestört werden. Azid und Arsenat werden fast zeitgleich mit Nitrat eluiert, so daß keine quantitative Auswertung von Nitrat möglich wäre. Das Chloration mit einer Retentionszeit von 15,40 min interferiert nicht mit anderen Anionen und erlaubt eine problemlose Integration. Es erfüllt somit die an einen internen Standard gestellten Anforderungen. Die uns bisher bekannten Nitratmessungen sind stets mit der Methode des externen Standards verwendet worden (Böhn et al., 1993; Michigami et al., 1989; Leone und Kelm, 1996; Jong und Burggraaf, 1983).

## **5.2 Extraktion**

### **5.2.1 Ultrafiltration**

Heterogene Körperflüssigkeiten zwingen zu Probenvorbereitungen. Es sind Proteinfällungen z.B. mit Silberchlorid, 30% Zinksulfat oder 5-Sulpho-Salicylsäure beschrieben worden (Hegesh und Shiloah, 1982; Pratt et al., 1995; Shi et al., 1993). Die Ultrafiltration zur Proteinabtrennung ist bereits 1984 bei Bromidmessungen durchgeführt worden (Miller und Cappon, 1984). Diese Methode der Proteinfällung haben wir ebenfalls durchgeführt, wobei jedoch längere Zentrifugationszeiten bei wahrscheinlich größeren Probenvolumina angegeben werden (Böhn et al., 1993; Preik und Kelm, 1996). Eine Verfälschung der quantitativen Auswertung von Nitrat in den verschiedenen Matrices kann bei zusätzlichen Arbeitsschritten und Verwendung von verschiedenen Probengefäßen, Pipetten oder Kartuschen durch Kontamination mit Nitrat auftreten. Die Ultrafilter Centrisart wurden vor Verwendung entsprechend mit Reinstwasser gewaschen. Systematisch sind die Möglichkeiten der Nitratkontamination überprüft worden, was durch jeweiliges Chromatographieren der Einzelschritte geschah. Es konnte keine Quelle der Nitratkontamination in den etablierten Analysenschritten im Rahmen unserer Methodik festgestellt werden.

### **5.2.2 Flüssig-flüssig-Extraktion**

Entgegengesetzt der bekannten Literatur haben wir durch eine Proteinfällung keine ausreichende Extraktion zur Darstellung einer Ionenchromatographie erreicht. Durch Flüssig-flüssig-Extraktionen mit den Substanzen Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat, Diethylether ließen sich störende Matrixbestandteile nicht extrahieren bzw. war die Chromatographie der Analyten nicht möglich, da keine Baseline gefunden wurde.

### **5.2.3 Flüssig-fest-Extraktion**

Zur weiteren Extraktion der unbekannten Verunreinigung in der Chromatographie wurde das Flüssig-fest-Extraktionsverfahren mit Sep-Pak-Säulen eingesetzt. Diverse Sep-Pak-Sorten wurden auf ihre Eignung geprüft. Jedoch ergaben die Aufarbeitungen mit den verschiedenen keine quantitativ auswertbaren Ergebnisse. Bei der Aufarbeitung mit Sep-Pak C18 light konnte jedoch ohne Verlust die eingesetzte Nitratmenge ohne Störungen gemessen werden. Mit C18 Säulen können hydrophobe Substanzen, Peptide oder Oligonukleotide abgetrennt werden.

## **5.3 Übertragung der Methode auf andere Medien**

### **5.3.1 Urin**

Da die Nullhypothese nicht widerlegt werden konnte und auch gleiche Ergebnisse die graphische Darstellung nach Bland and Altman uns lieferte, somit kein Unterschied zwischen den Methoden zur Messung von Nitrat im Urin bestand, wurde die einfache Methode der direkten Injektion nach Zentrifugation von 5min bei einer Verdünnung 1:3 verwendet. Diese Methode der direkten Injektion zur Nitratmessungen im Urin mit internem Standard anhand einer HPLC-Methode mittels Leitfähigkeitsdetektor ist bislang nicht beschrieben. Nitratmessungen im Urin mit ebenfalls direkter Injektion, aber anderer Verdünnung, im Anschluß einer UV-Detektion sind aber erwähnt (Michigami et al., 1989). Es ist keine andere Methode der Nitratmessung zur Validierung der Nitratkonzentration im Urin erfolgt.

### **5.3.2 Zellmedium**

Die Serummethode wurde direkt auf das Zellmedium zur Messung von Nitrat durch In-vitro-Äquilibration übertragen. Auf diese Weise ergab sich eine bessere Auswertung.

## 5.4 Quantifizierung

Da wir in verschiedenen Matrices wie Serum, Urin und Zellmedium anhand eines gleichbleibenden Systems Nitratkonzentrationen messen, ist nach Überprüfung der rein wäßrigen Eichung ( $r^2=0,999$ ), der wäßrigen Sep-Pak-Eichung ( $r^2=0,999$ ) und der Serum Sep-Pak-Eichung ( $r^2=0,998$ ), die rein wäßrige Eichung sehr gut geeignet. Es findet eine zeitsparende, kostengünstige, nicht störungsanfällige Eichung statt. Aufgrund des physiologischen Vorkommens des Analyten Nitrat im Urin hätten keine Eichkurven erstellt werden können.

## 5.5 Qualitätssicherung

Die Stabilitätsmessungen im Serum und im Urin zeigen, daß eine Lagerung im Kühlschrank über maximal drei Tage möglich ist, was aber nicht praktiziert wurde. Die Proben und auch die Kontrollseren werden, wenn nicht sofort aufgearbeitet, zentrifugiert und bei  $-40\text{ °C}$  für max. fünf Wochen gelagert. Wahrscheinlich sind die Proben aber noch länger stabil. Von eingefrorenen Nitratplasma-proben weiß man, daß sie für mindestens ein Jahr stabil sind (Moshage et al., 1995).

Diese Auswertung zeigt, daß die Messungen präzise und reproduzierbar sind und damit geringen Meßschwankungen unterliegen.

Die untere Empfindlichkeitsgrenze bei  $10\mu\text{mol/l}$  mit 10-15% Abweichung im Serum ist für unsere Fragestellung absolut ausreichend. In der Arbeit von Böhn et al. wird ebenfalls von einer Empfindlichkeit von  $10\mu\text{mol/l}$  bei einer Ionenchromatographie mit UV-Detektor und Leitfähigkeitsdetektor zur simultanen Messung von verschiedenen Anionen berichtet (Böhn et al., 1993). Es ist jedoch nicht deutlich, um welches Anion es sich handelt oder ob alle Anionen dieselbe Empfindlichkeit in der quantitativen Analyse aufweisen. 1996 wurde eine Empfindlichkeit bis zu  $0,5\mu\text{mol/l}$  Nitrat in biologischen bzw. wäßrigen Medien angegeben, wobei auch hier wiederum mit einem UV-Detektor und EC-Detektor, letzterer zur Messung von Nitrit, gearbeitet wird (Preik und Kelm, 1996).

## 5.6 Anwendung der etablierten HPLC Methode

Das stabile Stoffwechselendprodukt Nitrat gilt als Indikator für das endogen gebildete oder exogen zugeführte NO. Anhand der etablierten Methode wurden Nitratkonzentrationen im Serum und Urin bei Patienten mit inhalativer NO-Therapie zu den Zeitpunkten vor NO, 1h nach Beginn der iNO-Therapie, 24h während iNO, 24h, 48h und 72h nach iNO ermittelt. Zu den Abnahmezeitpunkten erfolgte zusätzlich eine Met-Hb Bestimmung, welche ebenfalls als ein Indikator für die NO-Zufuhr gesehen werden kann.

Das inhalativ aufgenommene NO passiert die Alveolen, um dann in den Blutkreislauf zu gelangen. Da aber NO nur eine sehr kurze HWZ hat, exogenes NO direkt nicht in der Peripherie nachweisbar ist, wird das sehr viel stabilere Stoffwechselendprodukt Nitrat in der Peripherie (Serum, Urin), gemessen. Dies sollte mittels der von uns zu erarbeitenden und entwickelten Methode gezeigt werden.

Bei den iNO-Patienten lassen sich sowohl im Serum als auch im Urin gleichläufige Veränderungen der Nitratkonzentration erkennen, bis auf einen Patienten, dessen Nitrat-Maximum im Urin erst 24h nach iNO-Gabe erreicht wurde. Hier könnte man eine akute Niereninsuffizienz bzw. eine verminderte Kreatininclearance vermuten. Ein Fehler in der Aufarbeitung ist zudem nicht auszuschließen. Die NO-Inhalation war in der ersten Stunde standardisiert 20ppm. Danach ist die iNO-Gabe individuell auf den Patienten verlaufen, dennoch bewegen sich die die NO-Gaben bis während 24h NO zwischen 16-23ppm, Ausnahme ein Patient K.,M. mit iNO von 40ppm w 24h NO. Es ist anhand der Werte keine deutlich hohe Korrelation ( $r=0,421$ ) zwischen steigender iNO Konzentration und den Nitratkonzentrationen im Serum, bei etwas besserer Korrelation  $r=0,538$  im Urin zu erheben. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Stichprobenzahl zurückzuführen. Im weiteren kann nur über die gegebene Konzentration eine Aussage gemacht werden. Nicht jedoch, ob diese Konzentration tatsächlich an den Zielort gelangt bzw. entsprechend die Abbauprodukte in die Peripherie gelangen.

Die Nitratkonzentration im Serum vor NO-Inhalation ist  $31,86\mu\text{M} \pm 11,35$  und im Urin  $346,20\mu\text{M} \pm 22,65$ . Diese Werte sind ähnlich den erhobenen Nitratkonzentrationen bei den Patienten ohne iNO-Therapie, die als Kontrollwerte anzusehen sind und gleichzeitig die Normalkonzentrationen des Nitrates widerspiegeln sollen.

Während der ersten Stunde der NO-Inhalation stieg das Nitrat im Serum bereits signifikant auf  $77,29\mu\text{M} \pm 43,60$  an. Das Maximum wurde bei 24 Stunden während NO bei  $234,00\mu\text{M}$

$\pm 121,35$  erreicht. Bereits 24 h nach iNO ist ein deutlicher, aber noch signifikanter Abfall auf  $75,57\mu\text{M} \pm 30,99$  zu verzeichnen, und nach 48h sind die Nitratkonzentrationen den Ausgangswerten vergleichbar. Anders verhält sich das Nitrat im Urin. Hier stieg nur gering nach einer Stunde das Nitrat auf  $444,00\mu\text{M} \pm 287,28$  an bei Ausgangswerten von  $346,20\mu\text{M} \pm 22,65$ . Bei den vorgegebenen Zeitpunkten ist das Maximum des Anstieges 24h während NO bei  $1225,40\mu\text{M} \pm 293,86$  erreicht. Nur sehr viel langsamer fällt die Nitratkonzentration im Urin. Nach Absetzen der NO-Therapie ist nach 24h noch eine Konzentration von  $655,80\mu\text{M} \pm 251,02$ , nach 48h nur noch  $436,40\mu\text{M} \pm 234,03$ , um sich dann nach 72h NO Gabe den Ausgangswerten zu nähern. Bei den iNO-Patienten wird das durch die exogen zugeführte inhalative NO-Therapie und im Rahmen der Verstoffwechslung entstandene Nitrat im Urin in den ersten 48h ausgeschieden. Ähnlich sind die Ergebnisse von Wenmalm et al., die bei gesunden, erwachsenen Probanden die  $^{15}\text{NO}_3^-$ - Ausscheidung im Urin gemessen haben. Das aus dem inhalative  $^{15}\text{NO}$  entstandene  $^{15}\text{NO}_3$  wird innerhalb der ersten 48h, vor allem aber in den ersten 24h ausgeschieden (Westfelt et al., 1995). Die Urinausscheidung nach oraler Nitratbelastung erreicht nach 4-6h ihr Maximum und kehrt bereits nach ca. 18h, auf Normwerte zurück (Evans et al., 1994). Bei den Ergebnissen von Wenmalm handelt es sich jedoch um gesunde, erwachsene Probanden, im Gegensatz zu unserem Patientengut, mit intensivpflichtigen Kindern.

Das aufgestellte Modell in vivo mit verschiedenen Nitratmessungen im Serum und Urin zu verschiedenen Zeitpunkten verdeutlicht auf eine einfache Weise den Stoffwechsel von exogen zugeführtem NO. Da auch vor der iNO Therapie jeweils Messungen durchgeführt wurden, können die erhobenen Nitratkonzentration die endogene NO-Produktion widerspiegeln. Eine bessere Verlaufsbeobachtung bei jeweils dem einzelnen Patienten zur iNO-Belastung besteht bei Erhebung der Ausgangswerte von Nitrat, d.h. vor iNO-Therapie. Allerdings ist anhand des Modells nicht deutlich erkennbar, ob eine Sättigung der Nitratkonzentration während der iNO-Therapie erreicht wurde, oder ob, wie vermutet, ein linearer Anstieg der Nitratkonzentration im Serum in Abhängigkeit der iNO-Gabe besteht bzw. im Urin ein entsprechender Anstieg zeitversetzt zu verzeichnen ist.

Der Ausgangswert des Met-Hb ist 0,2%. Bei dem Vergleich der Met-Hb Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten erkennt man einen signifikanten Anstieg von Met-Hb bereits 1h nach Beginn der iNO-Therapie, der im Verlauf trotz kontinuierlicher iNO-Gabe keine deutliche Veränderung zeigt. Met-Hb Messungen können somit ein Hinweis für exogen zugeführtes



NO in vivo sein, sind jedoch nicht aussagekräftig, um Information über die bestehende Belastungsdauer einzuholen, da keine deutlicher Anstieg während der iNO-Gabe bei unseren Patienten zu verzeichnen war. Die Messung von Nitrat als Stoffwechselendprodukt des NO kann hingegen deutlicher, die bestehende iNO Belastung aufzeigen. Sobald die NO-Zufuhr gestoppt wird, sinkt das Met-Hb auf Normalwerte, wobei die Nitratkonzentrationen ebenfalls sinken bei noch erhöhten Werten im Serum auch 24h nach Absetzen von iNO. Das Met-Hb, ein Reaktionsprodukt des NO-Hb-Konjugats Nitrosohämoglobin, mit sehr hoher Affinität zu NO scheint sich aufzusättigen. Met-Hb stellt in vivo jedoch nur einen Weg des Abbaus dar. Es gibt andere Abbaewege für NO, bei denen  $\text{Fe}^{2+}$ -S-Komplex enthaltende Proteine wie z.B. Glutathion oder Metalloproteine wie Cytochrome c, Succinatdehydrogenase, Tyrosinase und Caeruloplasmin mitwirken. Trotzdem läßt sich ein gewisser linearer Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen Nitrat und Met-Hb in vivo bei  $r=0,632$  aufstellen. Dies ist damit zu erklären, das der Abbau über Hämoglobin und entsprechender Met-Hb Bildung den größten Anteil einnimmt.

Die Nitratwerte im Serum bei Kindern im Alter von 1-18 Jahren sind  $43,41\mu\text{M} \pm 16,97$ . Die Nitratwerte im Urin bei Kindern im Alter von 0,6-15 Jahren sind  $628,20\mu\text{M} \pm 428,06$ . Die Nitratkonzentrationen im Serum sind weder vom Alter noch vom Geschlecht abhängig, was mit anderen Untersuchungen übereinstimmt (Böhn et al., 1994; Leone und Kelm, 1996). Die erhobenen Konzentrationen weichen nicht von denen in der Literatur beschriebenen mit  $19,7\mu\text{mol/l}$  bis  $44\mu\text{mol/l}$  bei gesunden Erwachsenen im Serum und bei Kindern mit  $34,97\mu\text{M} \pm 4,1$  ab (Viinkka, 1996; Shi et al., 1993). Urinkonzentrationen bei Kindern unter nitratarmer Diät werden mit  $51\mu\text{mol}/24\text{h}$  bis  $260\mu\text{mol}/24\text{h}$  und bei Erwachsenen von  $54,13$  bis  $204\mu\text{mol/l}$ , bei gesunden Erwachsenen ohne nitratarmer Diät mit  $925 \pm 217\mu\text{mol/l}$  Nitrat angegeben (Michigami et al., 1989; Hegesh und Shiloah, 1982; Westfelt et al., 1995). Ein Teil des gemessenen Nitrates ist deutlich exogen zugeführt. Die gemessenen Normalwerte von Nitrat können nur zum Teil die endogene NO Produktion aus L-Arginin über NOS widerspiegeln. Der Nitratpool setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen: Es erfolgt eine Nitrataufnahme über Nahrungsmittel, Wasser, einschließlich über nitratproduzierende Medikamente. In der Luft kann NO durch die Luftverschmutzung eingeatmet werden und es findet eine Nitratsynthese durch Bakterien im Gastrointestinaltrakt statt. Der Unterschied zwischen Normalwerten von Nitrat mit und ohne Diät wird an den o.g. Konzentrationen im Urin deutlich. Bei den von uns erhobenen Normalwerten im Urin und Se-

rum ist zwar keine spezielle nitratararme Diät vorausgegangen, aber die intensivpflichtigen Patienten erhielten keine nitrathaltige Nahrung und keine nitratproduzierenden Medikamente. Sie wiesen zudem keine Infekt- oder Sepsiszeichen auf, was ebenfalls zu Nitratanstieg führen kann. Die Ausgangswerte im Serum und Urin der iNO-Patienten, können somit definiert werden als Normalwerte mit geringer exogener Nitratbelastung. Dies ist wahrscheinlich der Grund, für die geringere Nitratkonzentration im Serum und Urin im Vergleich mit den von uns erhobenen Normalwerten bei Patienten ohne iNO. Auch diese Patienten hatten zumindest keine Infektzeichen bzw. NO-Donator Medikamente. Somit spiegeln die Nitratkonzentrationen der iNO Patienten die endogene Nitratproduktion besser wider.

Bei der in vitro NO-Äquilibration über die Bestimmungszeitpunkte 0, 30, 60, 90min steigen die Nitratkonzentrationen und das Met-Hb im Zellmedium entsprechend der eingesetzten NO-Konzentrationen mit 18, 32, 80ppm an. Die Erythrozyten im Zellmedium sind in vitro neben der Met-Hb Bildung auch in der Lage das NO zu dem Stoffwechselprodukt Nitrat abzubauen. Eine deutliche Dosis- und Zeitabhängigkeit konnte anhand des in vitro Modells in bezug auf Nitrat und Met-Hb Bildung gezeigt werden. Die in vitro erhobenen Nitratkonzentrationen und Met-Hb Werte zeigen eine gute Korrelation von  $r=0,928$ . Beide Modelle sowohl in vivo und in vitro zeigen den Stoffwechsel des exogen zugeführten NO auf. Allerdings sind in vivo und in vitro Messungen der beiden Parameter, Nitrat und Met-Hb, in einem anderen Zeitrahmen erfolgt. Beide Systeme geben Information über die Ausgangswerte und die Änderung im Verlauf durch exogene Zufuhr von NO. Die Anzahl der erhobenen in vitro Messungen ist erheblich größer. Bei dem vorliegenden Patientenkollekt sind die in vivo NO Konzentrationsgaben nicht in dem Maße standardisiert durchführbar wie in vitro. Das in vitro Modell zeigt sehr gut den Stoffwechselweg des exogen zugeführten NO. Durch die Messung des Nitrates wird deutlich, daß das Hämoglobin einen großen Anteil der Inaktivierung des NO während des Versuchsablaufs der 90min übernimmt und andere mögliche Inaktivatoren des NO scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, eine Methode zur Nitratmessung mittels der HPLC zu finden. Mit der etablierten Methode wurde anhand von inhalativer NO-Gabe der Stoffwechsel des Stickstoffmonoxid in vivo untersucht und mit dem bisher klinisch angewandten einzigen Indikator Met-Hb verglichen. Zusätzlich wurden Erythrozyten in vitro mit NO in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Im weiteren sind Normalwerte für Nitrat im Serum und Urin bei Kindern (in vivo) erhoben worden.

Aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Nitrates wurde eine Anionenaustauschersäule mit hoher Kapazität und guter chromatographischer Effizienz gewählt worden. Das Eluens basiert auf einem Borat/Gluconatgemisch mit Acetonitril und daraus resultierender Untergrundleitfähigkeit von 270µS mit entsprechendem Einsatz eines Leitfähigkeitsdetektors. Die Temperatur wurde konstant bei 37°C gehalten. Der Durchfluß betrug 2,0ml/min. Bei einer Laufzeit von 25min sind die Retentionszeiten[min] für den internen Standard Chlorat  $10,33 \pm 0,30$  und für Nitrat  $11,27 \pm 0,30$ . Die Methode ist sowohl in pathologischen als auch physiologischen Bereichen zur Nitratmessung präzise. Die wäßrigen Eichkurven sind von 50 bis 800µM linear, mit einem Bestimmtheitsmaß  $r^2=0,999$ . Eine untere Empfindlichkeit von 10µmol/l Nitrat für die vorgesehenen Messungen ist völlig ausreichend.

Untersucht wurden die Nitratkonzentrationen im Serum, Urin und Erythrozyten im Zellmedium. Das eingesetzte geringe Probenvolumen von 300µl Serum und 100µl Urin ist deshalb von Bedeutung und Vorteil, da die Nitratmessungen bei Kindern durchgeführt wurden. Das asservierte Material kann bei -40°C über mind. 5 Wochen aufbewahrt werden. Die Proben werden mit einem Injektionsvolumen von 100µl in die HPLC gegeben. Zur Probenaufbereitung wurde eine Proteinabtrennung durch Ultrafiltration benutzt. Zur weiteren Verbesserung der Chromatographie, sind die Sep-Pak-Kartuschen C18 light im Sinne einer Flüssig-fest-Extraktion verwendet worden. Wegen der hohen Konzentrationen im Urin, wird dieser i.A. 1:3 verdünnt und nach Zentrifugation direkt auf die HPLC-Säule gegeben, da mit der direkten Injektion ebenfalls sehr gute Ergebnisse erzielt worden sind. Durch inhalative NO-Therapie bei den Patienten konnte gezeigt werden, daß das Stoffwechselendprodukt im Blut und im Urin nachweisbar ist. Nitrat kann wie Met-Hb auch als Indikator für die NO-Gabe gewertet werden und kann weitaus präzisere Angaben über die

NO-Belastung widerspiegeln. Im Gegensatz zu Met-Hb, welches sich im Laufe der NO-Belastung scheinbar in vivo aufsättigt, nicht jedoch in vitro.

Entsprechend der Verstoffwechslung und ca. 70% Ausscheidung von Nitrat über die Niere, kann Nitrat auch ca. 48h nach NO im Urin nachgewiesen werden.

Außerdem sind Messungen zu Normalwerten im Urin und Serum bei Kindern durchgeführt worden.

Die in vitro NO-Äquilibration der Erythrozyten im Zellmedium konnte die enge Korrelation von NO und Nitratentstehung und dem Met-Hb, dem Konjugationsprodukt von NO, sehr gut verdeutlichen.

Die etablierte Methode eignet sich nicht nur zur Messung von durch NO-Inhalation entstandenem Nitrat, sondern kann auch bei Fragestellungen, wie Nitratbildung bei Sepsis oder gastrointestinalen Infekten i.R. des zu erwartenden NO-Anstiegs verwendet werden. Die Methode gibt zudem Hinweise über die endogene NO-Produktion, wobei stets andere bisher bekannte Nitratreservoirs beachtet werden sollten.

## 7 Literaturverzeichnis

- Altman DG, Bland JM (1983): Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician* 32: 307-17
- Änggård E (1994): Nitric oxide: mediator, murder and medicine. *Lancet* 334: 1199-206
- Böhn I, Niessen KH, Reineke F, Teufel M (1993): Simultane Bestimmung anorganischer Anionen in Körperflüssigkeiten. *Klin Pädiatr* 205: 1-5
- Bland JM Altman DG, (1986): statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1: 307-10
- Culotta E, Koshland DE (1992): NO news is good news. *Science* 258: 1862-5
- Demirakca S, Dötsch J, Knothe C, Magsaam J, Reiter HL, Bauer J, Kuehl PG (1996): Inhaled nitric oxide in neonatal and pediatric acute respiratory distress syndrome. Dose response, prolonged inhalation, and weaning. *Crit Care Med* 24(11): 1913-9
- Dellinger RP, Zimmermann JL, Taylor RW, Straube RC, Hauser DL, Criner GJ, Davis K Jr, Hyers TM, Papadakos P (1998): Effects of inhaled nitric oxide with acute respiratory distress syndrome: results of a randomised phase II trial. Inhaled nitric oxide in ARDS Study Group. *Crit Care Med* 26(1): 15-23
- Eppert GJ (1997): Flüssigchromatographie, HPLC-Theorie und Praxis. 3. Auflage, Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden
- Evans T, Rasmussen K, Wiebke G, Hibbs JB (1994): Nitric oxide synthesis in patients with advanced HIV infection. *Clin Exp Immunol* 97: 83-6
- Everett SA, Dennis MF, Tozer GM, Prise VE, Wardmann P, Stratford MRL (1995): Nitric oxide in biological fluids: analysis of nitrite and nitrate by high-performance ion chromatography. *J Chromatogr A* 706:437-442
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980): The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-6
- Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS (1994): The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 538-51
- Gilliam MB, Sherman MP, Griscavage JM, Ignarro LJ (1993): A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Anal Biochem* 212: 359-65
- Gjerde DT, Fritz JS, Schmuckler G (1979): Anionen chromatography with low-conductivity eluents. *J Chromatogr* 186: 509-19

- Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR (1981): Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7764-8
- Green LC, Wagner DA, Glokowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982): Analysis of nitrate, nitrite and [ $^{15}\text{N}$ ] nitrate in biological fluids, *Anal Biochem* 126: 131-8
- Hegesh E, Shiloah J (1982): Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta* 25: 107-115
- Heisz O (1987), *Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie*, Hüthig Verlag, Heidelberg
- Jong de P, Burggraaf M (1983): An ion chromatographic method for the simultaneous determination of inorganic phosphate, bromide, nitrate and sulphate in human serum. *Clin Chim Acta* 132: 63-70
- Kirkeboen KA, Strand OA (1999): The role of nitric oxide in sepsis - an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 43 (3): 275-88
- Knowles RG, Moncada S (1992): Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* 17: 399-402
- Leone AM, Kelm M (1996): Capillary electrophoretic and liquid chromatographic analysis of nitrite and nitrate, *Methods in Nitric Oxide Research* Chapter 34: 499-507
- Michigami Y, Yamamoto Y, Ueda K (1989): Determination of nitrite, sulphate, bromide and nitrate in human serum by ion chromatography. *Analyst* 114: 1201-5
- Miller ME, Cappon CJ (1984): Anion-exchange chromatographic determination of bromide in serum. *Clin Chem* 30: 781-3
- Mitchell HH, Shenle HA, Grindley HS (1916): The origin of nitrate in the urine. *J Biol Chem* 24: 461-90
- Moncada S, Higgs A (1993): The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-12
- Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL (1995): Nitrite and Nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 41: 892-6
- Ochoa JB, Udekwu A, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB (1991): Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 214: 621-5
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987): Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-6

- Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S (1988): L-Arginine is the physiological precursor for formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1251-6
- Petros A, Bennett D, Vallance P (1991): Effect of nitric synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 338: 1557-8
- Pratt PF, Nithipatikom K, Campbell WB (1995): Simultaneous determination of nitrate and nitrite in biological samples by multichannel flow injection analysis. *Anal Biochem* 231: 383-6
- Preik H, Kelm M (1996): Determination of nitrite in human blood by combination of a specific sample preparation with high-performance anion-exchange chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr B* 685: 348-52
- Rabelink AJ (1998): Nobel prize in medicine and physiology 1998 for the discovery of the role of nitric oxide as a signalling molecule. *Ned Tijdschr Geneesk* 142: 2828-30
- Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM (1992): Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 340: 818-19
- Roberts JD, Polaner DM, Todres ID, Lang P, Zapol WM (1991): Inhaled nitric oxide (NO): a selective pulmonary vasodilator for the treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN). *Circulation Suppl II* 84: II-321
- Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM (1993): Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 328: 399-405
- Russel IA, Zwass MS, Fineman JR, Balea M, Rouine-Rapp K, Brook M, Hanley FL, Silverman NH, Cahalan MK (1998): The effects of inhaled nitric oxide on postoperative pulmonary hypertension in infants and children undergoing surgical repair of congenital heart disease. *Anaesth Analg* 87(1): 46-51
- Sachs L (1992): *Angewandte Statistik*, siebente Auflage, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- Schulz R, Nava E, Moncada S (1992): Induction and potential biological relevance of  $\text{Ca}^{2+}$ -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 105: 575-80
- Shi Y, Li HQ, Shen CK, Wang JH, Qin SW, Liu R, Pan J (1993): Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis. *J Pediatr* 123: 435-8
- Skimming JW (1998): Nitric oxide inhalation therapy for newborn infants. *Curr Probl Pediatr* 28(8): 253-64

- Stratford MR (1999): Measurement of nitrite and nitrate by high-performance ion chromatography. *Methods Enzymol* 301: 259-69
- Troncy E, Francoeur M, Gilbert B (1997): Inhaled nitric oxide: clinical applications, indications, and toxicology. *Can J Anaesth* 44: 973-988
- Tsikas D, Böger RH, Bode-Böger SM, Gutzki FM, Frölich JC (1994): Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their  $^{15}\text{N}$ -labelled analogs. *J Chromatogr B* 661: 185-91
- Unger KK (1989), *Handbuch der HPLC, Teil 1*, GIT Verlag, Darmstadt
- Vallance P, Moncada S (1993): Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz* 1: 77-86
- Viinikka L (1996): Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest* 56: 577-81
- Wessel DL, Adatia I, Giglia TM, Thompson JE, Kulik TJ (1993): Use of inhaled nitric oxide and acetylcholine in the evaluation of pulmonary hypertension and endothelial function after cardiopulmonary bypass. *Circulation* 88: 2128-38
- Wessel DL, Adatia I, Van Marter LJ, Thompson JE, Kane JW, Stark AR, Kourembanas S (1997): Improved oxygenation in a randomised trial of inhaled nitric oxide for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 100(5): E7
- Westfelt UN, Benthin G, Lundin S, Stenqvist O, Wennmalm Å (1995): Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. *Br J Pharmacol* 114: 1621-4



## 8 Anhang

### Laborwerte der iNO-Patienten vor Gabe von NO

Name	Geb.	Alter [Jahre]	Größe [cm]	KG [kg]	KÖF [cm²]	CRP [mg/l]	Leuko- zyten [*10e 9/l]	Stab %/abs.	Seg %/abs.	Kreatinin [mg/dl]	Harnstoff [mg/dl]	Ausfuhr [ml/d]
F., D.	27.07.95	0,50	62	4,1	2665	15,8	22,7	26%	64%	0,5	42	250
B. P.	16.05.95	0,66	59	4,75	2799	49,3	2,8	52%	38%	0,3	nb	333
K. R.	14.06.95	0,41	62	5,7	3143	nb	7,1	15%	60%	0,6	17	250
S., A.	13.07.93	2,16	85	12,5	5450	nb	6,3	26%	56%	0,5	26	1280
K., P.	18.04.95	1,00	75	9,9	4556	nb	14,1	21%	64%	0,6	32	920
K., K.	21.08.94	1,75	90	12,5	5608	66,4	16,2	0,66	6,97	1,4	65	nb
K., M.	01.02.92	4,25	108	21,8	8112	16,3	14,6	0,73	11,97	2,3	160	1056

## Nitrat im Serum bei iNO-Patienten

Name/ Serum	vor NO Nitrat [ $\mu\text{mol/l}$ ]	1h w NO Nitrat [ $\mu\text{mol/l}$ ]	24h w NO Nitrat [ $\mu\text{mol/l}$ ]	24h n NO Nitrat [ $\mu\text{mol/l}$ ]	48h n NO Nitrat [ $\mu\text{mol/l}$ ]	72h n NO Nitrat [ $\mu\text{mol/l}$ ]	iNO m w 24h [ppm]
F., D.	32	80	428	110	25	41	15
B., P.	25	75	150	41	24	24	20
K., R.	35	62	248	107	43	39	20
S., A.	24	48	96	59	23	22	15
K., P.	55	172	314	93	69	36	21,5
K., K.	31	47	112	34	34	22	17,5
K., M.	21	57	290	85	29	47	30
m	31,86	77,29	234,00	75,57	35,29	33,00	
s	11,35	43,60	121,35	30,99	16,44	10,23	
p-Wert		0,016	0,016	0,016	0,313	0,984	

## Met-Hb bei iNO-Patienten

Name/ Serum	vor NO Met-Hb [%]	1h w NO Met-Hb [%]	24h w NO Met-Hb [%]	24h n NO Met-Hb [%]	48h n NO Met-Hb [%]	72h n NO Met-Hb [%]	iNO m w 24h [ppm]
F., D.	0,3	0,7	0,4	0,1	0,3	0,2	15
B., P.	0,1	0,8	0,2	0,2	0,1	0,1	20
K., R.	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,1	20
S., A.	0,3	0,5	0,5	0,3	0,2	0,2	15
K., P.	0,1	1,1	0,9	0,3	0,3	0,1	21,5
K., K.	0,3	0,5	0,2	0,1	0,3	0,1	17,5
K., M.	0,1	0,5	0,8	0,1	0,1	0,1	30
m	0,20	0,70	0,60	0,20	0,25	0,13	
s	0,11	0,22	0,32	0,11	0,08	0,05	
p-Wert		0,016	0,078	1,000	1,000	0,125	

## Nitrat im Urin bei iNO-Patienten

Name/ Urin	vor NO Nitrat [μmol/l]	1h w NO Nitrat [μmol/l]	24h w NO Nitrat [μmol/l]	24h n NO Nitrat [μmol/l]	48h n NO Nitrat [μmol/l]	72h n NO Nitrat [μmol/l]	iNO m w 24h [ppm]
F., D.	710	890	1355	750	720	666	15
B., P.	217	252	1209	351	297	225	20
K., R.	279	310	723,00	927	649	471	20
K., P.	390	570	1410,00	819	186	162	21,5
K., M.	135	198	1430,00	141	110	172	30
m	346,20	444,00	1225,40	655,80	436,40	339,20	
s	223,65	287,28	293,86	251,02	234,03	221,68	
p-Wert		0,063	0,063	0,063	0,813	1,000	

## Nitrat im Normalserum

Name	Alter	Geschlecht	Nitrat [μmol/l]
B., J.	1	m	46
P., S.	1	m	50
E., Y.	2	m	56
R., A.	2	m	35
S., A-E.	2	w	60
D., Z.	3	w	20
G., S.	4	w	21
B., A.	5	m	68
W.-S., C.	5	m	50
K., O.	5	m	18
J., J-U.	6	m	24
E., F.	6	m	46
W., J.	6	m	25
A., S.	6	m	31
N., C.	7	w	42
E., P.	8	m	49
B., K.	8	m	34
H., N.	9	w	26
F., A.	10	w	63
S., J.	10	m	43
T., S.	10	m	55
S., P.	13	m	37
R., T.	13	w	54
V., N.	14	w	92
G., E.	14	w	45
N., M.	15	m	52
C., Y.	18	w	30

## Nitrat im Normalurin

Name	Alter	Geschlecht	Leukozyten	Nitrat [μmol/l]	ln(Nitrat)
F.D.	0,6	m	0	710	6,57
J.L.	5	w	0	215	5,37
B.J.	6	m	0	335	5,81
S.D.	8	m	0	1551	7,35
Y.S.	11	m	0	920	6,82
B.S.	15	m	1	320	5,77
D.N.	0,5	w	1	100	4,61
V.M.	3	w	2	636	6,46
K.S.	4	w	5	595	6,39
G.M.	10	w	5	900	6,80

Tabellarische Darstellung von Nitrat und Met-Hb im Zellmedium durch NO-Äquilibration in verschiedenen Konzentrationen (0ppm, 18 ppm, 32 ppm und 80 ppm) zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 90 Minuten

0 ppm NO	t=0 min		t=30 min		t=60 min		t=90 min	
	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]
ZM1	24	0,3	29	0,2	26	0,2	19	0
ZM2	17	0,3	20	0,1	18	0,3	25	0,3
ZM3	23	0,2	19	0,1	20	0,4	23	0,3
ZM4	19	0,3	22	0,2	21	0,3	24	0,3
m	20,75	0,28	22,5	0,15	21,25	0,3	22,75	0,23
s	3,30	0,05	4,51	0,06	3,40	0,08	2,63	0,15
p-Wert			0,446		0,703		0,534	

18 ppm NO	t=0 min		t=30 min		t=60 min		t=90 min	
	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]
ZM1-	0	0,3	51	0,1	90	0,5	139	0,9
ZM2	20	0,3	56	0,2	72	0,3	132	0,8
ZM3	24	0,3	55	0,3	111	0,6	145	0,9
ZM4	29	0,3	43	0,2	107	0,7	166	1,1
m	18,25	0,3	51,25	0,2	95	0,525	145,5	0,925
s	12,71	0,00	5,91	0,08	17,83	0,17	14,66	0,13
p-Wert			0,023		0,003		0,003	

32 ppm NO	t=0 min		t=30 min		t=60 min		t=90 min	
	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]
ZM1	40	0,1	74	0,5	105	0,8	164	1
ZM2	0	0,2	70	0,5	124	0,9	198	1,3
ZM3	15	0	52	0,3	97	0,8	187	1,1
ZM4	18	0,3	69	0,4	114	0,8	201	1,1
m	18,25	0,15	66,25	0,425	110	0,825	187,5	1,125
s	16,50	0,13	9,74	0,10	11,63	0,05	16,78	0,13
p-Wert			0,002		0,005		0,002	

80 ppm NO	t=0 min		t=30 min		t=60 min		t=90 min	
	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]	Nitrat [μmol/l]	Met-Hb [%]
ZM1	25	0,3	66	0,5	161	1,2	276	3
ZM2	23	0,3	98	1,2	195	1,9	324	3,4
ZM3	0	0,3	85	0,7	179	1,9	279	3,1
ZM4	0	0,3	91	1,1	189	2	300	3,3
m	12	0,3	85	0,86	181,00	1,75	294,75	3,2
s	13,88	0,00	13,74	0,33	14,88	0,37	22,23	0,18
			0,0001		0,0001		0,0001	

t=Zeit in Minuten, ZM=Zellmedium

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Esra Tas
Geburtsdatum	25.05.1970
Geburtsort	Ankara - Türkei
Nationalität	deutsch
Anschrift	Vom Stein Str. 5 67125 Dannstadt

### Ausbildungsgang

1982–1987	Gymnasium Anna Sophianeum, Schöningen
1987–1988	St. Bede's School, Upper Dicker, England
1988–1990	Internatsgymnasium Pädagogium, Bad Sachsa
05/90	Abitur
10/90–10/91	Studium der Mineralogie an der RWTH Aachen
10/91–5/98	Studium der Medizin an der RWTH Aachen und Justus-Liebig-Universität Giessen
6/98-10/98	Beginn der Tätigkeit als Ärztin im Praktikum an der TOMESA Fachklinik, Bad Salzschlirf, Prof. Dr. Küster
10/98-10/99	Fortsetzung als ÄiP an der Universitäts-Hautklinik Freiburg, Dokumentationszentrum schwerer Hautreaktionen, Prof. Dr. Schöpf
11/99-04/01	Assistenzärztin an der Poliklinik Allergologie und Immuno- logie, Kantonsspital Basel, Basel, Schweiz, Prof. Dr. A.J. Bircher
05/01-02/02	Erziehungsurlaub
seit 03/02	Assistenzärztin Dermatologie bei Dres. Kaufmann/ Maurer, Weinheim

## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. P.-G. Kühl möchte ich meinen Dank für die freundliche Überlassung des Themas aussprechen. Herrn Dr. rer. nat. J. Schwandt danke ich für die fachliche Hilfestellung und sehr gute Zusammenarbeit während meiner Arbeit im HPLC Labor und auch noch nach Abschluß des praktischen Teils. Bei der Realisierung der Ideen hat er mich hervorragend unterstützt, was sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat. Dem HPLC Team, vor allem Frau Wardega und Frau Goritzka möchte ich ebenfalls für die tatkräftigen Unterstützungen im Bereich der Labortätigkeit danken.

Ich möchte meinen Dank an Herrn Dr. med. Demirakca und Herrn Dr. med. Dötsch richten, die mir bei der Ausführung der klinischen Tätigkeit stets zur Seite gestanden haben.

Ein Dankeschön gilt den Mitarbeitern der Intensivstation Bessau für Ihre Kooperation und Hilfe bei der Asservierung der Patientenproben.

Dank gebührt auch Herrn Dipl. Stat. J. Schlingmann für seine freundliche Unterstützung im Bereich der statistischen Auswertung der Arbeit.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Birgit bedanken, die mir bei der Strukturierung sowie Korrektur der Dissertation zur Seite stand.